

# Entwicklung eines transkriptionell regulierten Systems zur konditionalen Immortalisierung

***Von der*** Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
***genehmigte***  
D i s s e r t a t i o n

von Tobias May  
aus Gifhorn

1. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Bode
2. Referent:	Prof. Dr. R.Cerff
eingereicht am:	30.09.04
mündliche Prüfung (Disputation) am:	11.02.05
Druckjahr:	2005

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Zusammenfassung.....	IV
1.	Einleitung.....	1
1.1	Klassische Immortalisierungsmethoden.....	1
1.2	Unterschiede bei der Immortalisierung von humanen und murinen Zellen.....	2
1.3	Zellzyklus.....	3
1.3.1	Retinoblastoma Protein (pRB).....	3
1.3.2	Tumorsuppressorprotein 53 (p53).....	4
1.3.3	Der CDKN2a Locus (p16Ink4a und p19Arf).....	5
1.4	Simian Virus 40 Large T Antigen (TAg).....	6
1.5	Methoden zur konditionalen Immortalisierung.....	8
1.5.1	Hintergrund.....	8
1.5.2	Die temperatur-sensitive Mutante des TAg (tsTAg).....	9
1.5.3	Eliminierung des Immortalisierungsgens durch sequenzspezifische Rekombination.....	9
1.5.4	Transkriptionelle Regulation von Immortalisierungsgenen.....	11
1.6	Aufgabenstellung.....	13
2	Ergebnisse.....	14
2.1	Entwicklung eines Plasmidvektors zur konditionalen Immortalisierung.....	14
2.1.1	Einfluss der Dox-Konzentration auf die Expression.....	17
2.2	Vergleich von temperatur-sensitiven TAg mit transkriptionell reguliertem TAg....	19
2.2.1	Vergleich der Regulationspotentiale der beiden konditionalen Immortalisierungsmethoden.....	19
2.2.2	Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Wachstumseigenschaften.....	21
2.2.3	Vergleich der Zellzyklusregulation von transkriptionell und temperatur- reguliertem TAg.....	23
2.3	Sind aktivierte pRITA-Zellen immortalisiert oder transformiert?.....	24
2.4	Charakterisierung der reprimierten pRITA-Zellen.....	26
2.4.1	Analyse des Proliferationsarrest.....	26
2.4.2	Reanimation seneszenten Zellen.....	28
2.5	Einfluss von TAg auf die Genexpression.....	31
2.5.1	Vergleich des Transkriptoms aktivierter und reprimierter Zellen.....	31
2.5.2	Charakterisierung der differentiell regulierten Gene.....	34
2.5.3	Einfluss der Reanimation auf das Genexpressionsmuster.....	37
2.6	Auswirkung der Immortalisierung mittels TAg.....	40
2.6.1	Spontane Mutationen in pRITA-immortalisierten Zellen.....	40
2.6.2	Sind reprimierte pRITA-immortalisierte Zellen primären Zellen ähnlich?.....	42
2.6.3	Irreversible Veränderung des Transkriptoms durch eine TAg-induzierte Immortalisierung.....	46
3	Diskussion.....	49
3.1	pRITA vermittelt strikte Proliferationskontrolle.....	50
3.1.1	Das autoreguliert Tet-System ist entweder an- oder ausgeschaltet.....	51
3.1.2	Das autoreguliert Tet-System verhält sich wie ein Hybrid aus Cre/loxP und binärem Tet-System.....	53
3.2	Vergleich des temperatur-sensitiven TAg mit transkriptionell reguliertem TAg....	54
3.2.1	Das transkriptionell regulierte TAg erlaubt eine striktere Wachstumskontrolle als die temperatur-sensitive Mutante.....	54

3.2.2	Die nicht permissive Temperatur (39°C) ruft starke klonale Variationen in der Proliferation hervor .....	56
3.3	Analyse der zellulären Stadien von aktivierten und reprimierten pRITA-Zellen ....	57
3.3.1	pRITA immortalisiert MEF ohne sie zu transformieren .....	57
3.3.2	Seneszenz .....	58
3.3.3	Reprimierte pRITA-Zellen sind seneszent .....	59
3.3.4	Revertierung der Seneszenz in pRITA-immortalisierten Zellen .....	60
3.4	Genexpressionsanalyse mittels „DNA-Chips“ .....	61
3.4.1	Experimentelles Vorgehen und Möglichkeiten der Genexpressionsanalyse ...	61
3.4.2	Einfluss der TAg-Regulation: globale Einflüsse .....	62
3.4.3	Einfluss der TAg Regulation auf das Transkriptom: Analyse auf Genebene ..	63
3.4.4	An- und Abschalten der mit pRITA-immortalisierten Zellen ruft nahezu identische Änderung im Genexpressionsprofil hervor .....	64
3.5	Weitere Eigenschaften der pRITA-Zellen .....	65
3.5.1	pRITA-Zellen sind genetisch nicht stabil .....	65
3.5.2	Reprimierte pRITA-Zellen unterscheiden sich signifikant von primären Zellen	67
3.5.3	Ist eine „weiche Immortalisierung“ möglich? .....	68
3.6	Ausblick .....	69
3.6.1	Vektorverbesserung .....	69
3.6.2	Transduktionsmethode .....	70
3.6.3	Zelllinien aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) oder transgenen Mäusen	71
3.6.4	Aufklärung molekularer Netzwerke mittels der „DNA-Chip“ Analyse .....	72
4	Material und Methoden .....	74
4.1	Geräte .....	74
4.2	Material .....	75
4.3	Allgemeine Grundtechniken .....	75
4.3.1	Sterilisieren durch Hitze .....	75
4.3.2	Sterilisieren durch Filtration .....	75
4.3.3	Phenolisieren von DNA .....	75
4.3.4	Fällung von DNA .....	75
4.4	DNA-Modifizierung (nach Maniatis et al., 1982) .....	76
4.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	76
4.4.2	Auffüllen von 5'-überstehenden Enden .....	76
4.4.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	76
4.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten .....	76
4.4.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988) .....	76
4.4.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	77
4.4.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen (QIAquick-Kit, Qiagen) .....	77
4.5	Arbeiten mit E.coli .....	78
4.5.1	Verwendete Bakterienstämme .....	78
4.5.2	Medien .....	78
4.5.3	Herstellung von Agarplatten .....	78
4.5.4	Herstellung elektrokompenter Bakterien .....	78
4.5.5	Elektrotransformation kompetenter Bakterien .....	78
4.5.6	Konservierung von Bakterien .....	79
4.5.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab .....	79
4.5.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im präparativen Maßstab (QIAGEN) .....	79
4.6	Eukaryontische Zellen und allgemeine Arbeitsmethoden .....	80

4.6.1	Verwendete Zelllinien .....	80
4.6.2	Grundmedien .....	80
4.6.3	Kulturbedien .....	81
4.6.4	Kultivierung von Zellen .....	81
4.6.5	Langzeitlagerung von Zellen .....	81
4.6.6	Gewinnung von embryonalen Mausfibroblasten (MEF) .....	81
4.6.7	Transfektion von MEF mittels Calciumphosphat/DNA-Präzipitation .....	82
4.6.8	Retrovirale Infektion von MEF .....	82
4.6.9	Spontane Immortalisierung mittels 3T3 Protokoll .....	82
4.7	Zellwachstumsexperimente und FACS-Analytik .....	82
4.7.1	Wachstumskurven .....	82
4.7.2	WST-Assay .....	83
4.7.3	Klonogenizität .....	83
4.7.4	Weichagartest .....	83
4.7.5	SA- $\beta$ -Gal Färbung (Dimri et al., 1995) .....	83
4.7.6	FACS Analyse des eGFP .....	83
4.7.7	FACS Analyse des TAg .....	84
4.7.8	Zellzyklusanalyse .....	84
4.7.9	BrdU-Färbung .....	84
4.8	Proteinanalytik .....	85
4.8.1	Zellextraktpräparation .....	85
4.8.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	85
4.8.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	85
4.8.4	„Western Blot“ des TAg .....	86
4.9	Genexpressionsanalyse .....	86
4.9.1	RNA Isolation .....	86
4.9.2	Synthese der gelabelten RNA .....	87
4.9.3	Hybridisierung der cRNA mit den „DNA-Chips“ .....	87
4.9.4	Datenanalyse der „DNA-Chips“ .....	87
4.9.5	„Gene Ontology“ Analyse .....	88
4.9.6	„Clusteranalyse“ .....	88
4.9.7	Analyse der Varianz „ANOVA“ .....	88
5	Vektoren und Oligonukleotide .....	90
5.1	Vektoren .....	90
5.1.1	Verwendete Vektoren .....	90
5.1.2	Hergestellte Vektoren .....	90
5.2	Primer/Oligomere .....	92
6	Abkürzungen .....	94
7	Literaturverzeichnis .....	96
Anhang	.....	104

## II. Zusammenfassung

Um zelluläre Prozesse auf molekularer Ebene aufklären zu können, sind Zelllinien ein unverzichtbares Werkzeug. Problematisch ist allerdings, dass die Mechanismen, die zur Immortalisierung der Zellen führen, die Zellphysiologie erheblich verändern. Dies kann auch einen entscheidenden Einfluss auf die Experimente nehmen. Daher wurden verschiedene Ansätze zur konditionalen Immortalisierung entwickelt, um die Immortalisierung und damit auch deren Einfluss auf die Zelle revertieren zu können.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur konditionalen Immortalisierung, welches eine strikte transkriptionelle Regulation des immortalisierenden Gens erlaubt. Hierzu wurde ein Tet-abhängiges autoregulierte System genutzt, welches so modifiziert wurde, dass alle nötigen Komponenten für Regulation, Selektion und Immortalisation (Simian Virus 40 Large T Antigen (TAg)) auf einem Plasmid (pRITA) vereinigt sind. Zunächst wurden mit Hilfe von pRITA embryonale Mausfibroblasten immortalisiert und anschließend deren Wachstumseigenschaften analysiert. Dabei zeigte sich, dass trotz Basalexpression der rekombinanten Gene dieses System eine sehr stringente Proliferationskontrolle der immortalisierten Zellen erlaubt. Weiterhin wurde diese Immortalisierungsmethode mit der Standardmethode zur konditionalen Immortalisierung, einer temperatur-sensitiven Mutante von TAg (tsTAg), verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass (1) das autoregulierte System eine effizientere Wachstumskontrolle vermittelt und (2) die Kultivierungsbedingungen, welche für die Regulation von tsTAg nötig sind, starke klonale Variationen hervorrufen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivierung von TAg in pRITA-Zellen zur Immortalisation und nicht zur Transformation führt, während die Inaktivierung von TAg pRITA-Zellen seneszent werden lässt.

Mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse wurden aktivierte und reprimierte pRITA-Zellen auch auf molekularer Ebene analysiert und miteinander verglichen, wobei grundlegende Unterschiede beider Zustände aufgezeigt wurden. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass pRITA sehr definiert in das Transkriptom eingreift, da bei zweimaliger Regulation nahezu identische Veränderungen im Genexpressionsmuster der Zelle hervorgerufen wurden. Allerdings konnte mit der „DNA-Chip“-Analyse auch gezeigt werden, dass die reprimierten pRITA-Zellen nicht primären Zellen ähneln, sondern beide Zellen sich stark voneinander unterscheiden.

Zwar weisen die reprimierten pRITA-Zellen deutliche Unterschiede zu primären Zellen auf, dennoch ermöglicht pRITA eine strikte Regulation des immortalisierenden Gens und damit auch dessen Einfluss auf die Zelle.

# 1. Einleitung

## 1.1 Klassische Immortalisierungsmethoden

Zelllinien sind für viele naturwissenschaftlichen Disziplinen zu einem unabkömmlichen Werkzeug geworden. Sie unterstützen beziehungsweise ermöglichen die Aufklärung verschiedenster Prozesse auf molekularer Ebene. Die mit ihrer Hilfe bearbeiteten Fragestellungen sind vielfältiger Natur und reichen beispielsweise von der Erforschung von Signalkaskaden oder Differenzierungsprozessen über genetische Studien bis hin zur biotechnologischen Anwendung.

Dabei haben Zelllinien gegenüber frisch isolierten Zellen mehrere Vorteile. Sie sind praktisch in unbegrenzter Menge verfügbar und besitzen darüber hinaus verglichen mit primären Zellen konstante Eigenschaften. Dies ist bei Primärkulturen ein kritischer Punkt, da sich verschiedene Chargen und auch Zellen verschiedener Passagen stark unterscheiden.

Ein wesentlicher Nachteil primärer Zellen ist die kurze Lebensdauer aufgrund ihres begrenzten Replikationspotentials. Für die Etablierung einer Zelllinie müssen die Mechanismen außer Kraft gesetzt werden, die das Replikationspotential begrenzen. Dies geschieht beispielsweise durch spontane Mutation von Tumorsuppressoren oder durch die Überexpression viraler Onkogene.

Bereits 1963 wurde von Todaro und Green gezeigt, dass ein bestimmtes Passagierungsprotokoll zur spontanen Immortalisierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) führt. Für dieses sogenannte 3T3 Protokoll müssen die Zellen alle drei Tage umgesetzt und mit einer bestimmten Zelldichte ausgesät werden. Nach acht bis zehn Passagen erreichen die Zellen ihr Replikationslimit und wachsen langsamer. Einzelne Zellen haben im Verlauf der Kultivierung spontane Mutationen akquiriert, die ihnen eine weitere Proliferation ermöglichen. Diese Zellen haben das Replikationslimit durchbrochen und sind immortalisiert. Später konnte nachgewiesen werden, dass das 3T3 Protokoll meist den Tumorsuppressor p53 inaktiviert (Harvey und Levine, 1991; Rittling und Denhardt, 1992). Daneben werden aber auch Mutationen in anderen Tumorsuppressoren wie p16Ink4a oder p19Arf induziert (Kamijo et al., 1997).

Limitierend ist, dass das 3T3 Protokoll sich nur für die spontane Immortalisierung von MEF eignet, während für andere Zelltypen komplexere Kultivierungsschemata benötigt werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die spontan auftretenden Mutationen heterogen sind, was eine erhebliche Variabilität zwischen verschiedenen 3T3 Zelllinien nach sich zieht. Diese

Heterogenität kann auch unterschiedlich stark die Experimente beeinflussen, wodurch die Deutung der Resultate erschwert wird.

Umgangen werden diese Probleme durch eine „gesteuerte“ Immortalisierung mit Hilfe viraler Onkogene. Hierzu gehören beispielsweise das Simian Virus 40 (SV40) Large T Antigen (TAg), E6 und E7 der humanen Papillomaviren oder die adenoviralen Proteine E1a und E1b. Alle genannten Onkogene inaktivieren mit p53 und pRB die wichtigsten Tumorsuppressoren der Zelle (siehe unten). Es konnte gezeigt werden, dass mit diesen Onkogenen in nahezu allen Zelltypen das Replikationslimit überkommen werden kann. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zu dem 3T3 Protokoll die Immortalisierung mittels dieser viralen Onkogene nicht auf eine bestimmte Zellart beschränkt ist. Allerdings werden durch die Immortalisation mittels viraler Onkogene enorme Veränderungen innerhalb der Zelle ausgelöst. Diese werden aber wahrscheinlich generell induziert, so dass diese Zelllinien verglichen mit spontan immortalisierten Zelllinien eine geringere Variabilität aufweisen.

Es muss aber festgehalten werden, dass aufgrund des enormen Einflusses der Onkogene auf die Zellphysiologie sich Zelllinien meist sehr deutlich von primären Zellen unterscheiden. Dies ist natürlich auch von der verwendeten Zelllinie/-art abhängig. Generell muss zwischen immortalisierten und transformierten Zelllinien unterschieden werden. Immortalisierte Zelllinien haben ihr Replikationslimit durchbrochen und weisen ein unbegrenztes exponentielles Wachstumsverhalten auf. Das gilt auch für transformierte Zellen, wobei diese im Gegensatz zu immortalisierten Zellen auch tumorigen sind und somit Tumore bilden können (Drayton und Peters, 2002).

## **1.2 Unterschiede bei der Immortalisierung von humanen und murinen Zellen**

Prinzipiell gilt, dass für eine Immortalisierung sowohl von humanen als auch von murinen Zellen Mechanismen inaktiviert werden müssen, die das Replikationslimit begrenzen. Allerdings gibt es zwischen beiden Spezies erhebliche Unterschiede, welcher Weg zur Immortalisierung führt. So treten bei MEF mit einer relativ hohen Frequenz Mutationen auf, die eine spontane Immortalisierung ermöglichen. Dies wird in humanen Zellen praktisch nicht beobachtet.

Auch die Länge der Proliferationsphase primärer Zellen unterscheidet sich bei beiden Spezies. So durchlaufen humane Fibroblasten rund 50 Zellteilungen (Hayflick und Moorehead, 1961), während murine Zellen bereits nach 8-10 Zellteilungen das Replikationslimit erreicht haben.



Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen den Spezies sind die Telomere. So wird für humane Zellen angenommen, dass die Verkürzung der Telomere, die bei jeder Zellteilung erfolgt, entscheidend für das Erreichen des Replikationslimit ist (Harley et al., 1990). Unterstützt wird dies durch eine Studie, die allein mit Überexpression der Telomerase eine Immortalisierung humaner Zellen ermöglichte (Bodnar et al., 1998). Dieses Enzym verhindert die Telomerverkürzung, indem es mehrere Wiederholungen der Sequenz „TTAGGG“ an die Chromosomenenden anfügt.

Diese Telomerverkürzung findet auch in murinen Zellen statt. Allerdings ist dies für das Erreichen des Replikationslimits nicht ausschlaggebend, da erstens murine Zellen sehr viel längere Telomere als humane Zellen besitzen und zweitens sehr viele murine Zellarten, unter ihnen auch MEF, Telomerase exprimieren (Wright und Shay, 2000). Vielmehr scheinen die artifiziellen Kulturbedingungen bei murinen Zellen einen sogenannten „Zellkulturschock“ auszulösen, der die Proliferationskapazität einschränkt (Sherr und DePinho, 2000).

### **1.3 Zellzyklus**

Um immortalisierte Zellen zu etablieren, muss der Zellzyklus permanent aktiv sein. Dies setzt voraus, dass die Kontrollmechanismen des Zellzyklusses inaktiviert sind. Die beiden wichtigsten Regulatoren in Säugerzellen sind pRB und p53. Verdeutlicht wird dies dadurch, dass nahezu alle Tumore Mutationen sowohl in dem pRB als auch in dem p53 Signalweg aufweisen (Sherr 2000).

#### **1.3.1 Retinoblastoma Protein (pRB)**

Der genaue Mechanismus mit dem pRB als Tumorsuppressor agiert ist bis heute noch nicht völlig geklärt. Die Aufklärung wird dadurch erschwert, dass pRB nicht nur an vielen verschiedenen zellulären Prozessen, wie Zellzykluskontrolle, Differenzierung, Apoptose und DNA Replikation beteiligt ist, sondern, dass auch eine Interaktion mit mehr als 100 Proteine nachgewiesen werden konnte (Übersicht in Classon und Harlow, 2002). Allerdings scheint die pRB Funktion größtenteils von der Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F-1 abzuhängen. E2F-1 bildet zusammen mit den Proteinen DP-1 oder DP-2 Heterodimere und aktiviert so die Expression von Genen, deren Produkte für den Eintritt in die S-Phase benötigt werden (Abb. 1) (Bagchi et al., 1991).

Das pRB kann die Genexpression sowohl indirekt als auch direkt inhibieren. Der indirekte Mechanismus läuft über die Bindung an Transkriptionsfaktoren wie E2F-1, wodurch diese nicht mehr in der Lage sind Gene zu aktivieren. Dies führt praktisch zu einem Austitrieren des Transkriptionsfaktors (Flemington et al., 1993). Allerdings kann das pRB auch mit E2F-1/DP

Heterodimeren an Promotoren binden und aktiv die Genexpression reprimieren. Hierbei scheinen Chromatinmodifikationen eine entscheidende Rolle zu spielen, wobei hauptsächlich die Histone des Promotorbereichs deacetyliert werden. Es konnte dabei gezeigt werden, dass das pRB Histondeacetylasen an den Promotor rekrutiert und so die Transkription reprimiert wird (Luo et al., 1998).

Unabhängig vom Repressionsmechanismus führt die Inhibierung von E2F-1 durch pRB zu einem Zellzyklusblock in der G1 Phase. Damit die Zelle in die S-Phase eintreten kann, muss der Block von pRB aufgehoben werden. Die Regulation von pRBs erfolgt über Phosphorylierungen, wobei das Protein im Verlauf des Zellzyklusses zwischen einem hypophosphorylierten (aktiv) und einem hyperphosphorylierten (inaktiv) Zustand pendelt (Chen et al., 1989) (Abb. 1). In der G1-Phase ist das pRB solange aktiv bis die Zelle zur Proliferation durch beispielweise Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Diese Stimulation führt zu einer Phosphorylierung des pRB durch Komplexe bestehend aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk), die damit dessen Inaktivierung auslösen (Hinds et al., 1992).

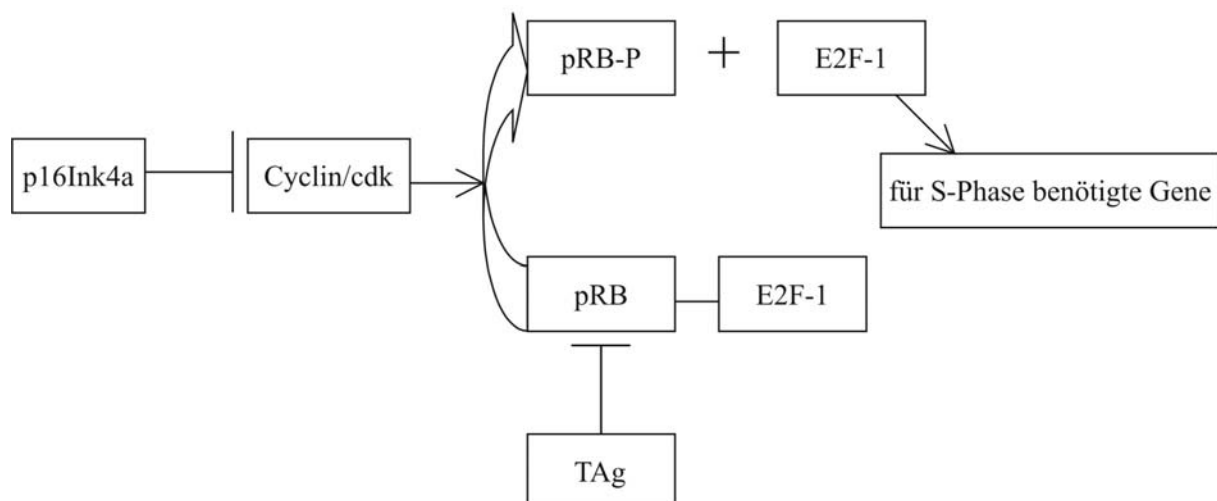


Abb. 1 pRB Signalweg

Schematische Darstellung der für die Tumorsuppression wichtigsten Prozesse im pRB Signalweg.

### 1.3.2 Tumorsuppressorprotein 53 (p53)

p53 ist Gegenstand intensiver Forschung, da dieses Gen in mehr als 50 % der menschlichen Tumoren mutiert ist (Levine 1997). Das p53 Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher durch verschiedene Stresssignale aktiviert wird. Dabei werden durch p53 je nach Zustand der Zelle unterschiedliche Antworten ausgelöst, wie zum Beispiel Zellzyklusblock, Differenzierung, DNA Reparatur, Apoptose oder Seneszenz (Übersicht in Vousden und Lu, 2002). Die Bedingungen, welche die Wahl des p53 Programms beeinflussen, sind bisher nicht gut charakterisiert.

Eins der p53 Zielgene ist MDM2, welches auch durch niedrige p53 Konzentrationen aktiviert wird (Abb. 2). Das MDM2 Protein bindet an p53 und inhibiert dessen transkriptionelle Aktivität. Darüber hinaus wird p53 auch durch MDM2 ubiquitinyliert. Diese posttranslationale Modifikation führt dazu, dass p53 durch Proteasomen degradiert wird (Fang et al., 2000). Somit induziert p53 seine eigene Degradation, wodurch normalerweise seine Konzentration in der Zelle niedrig ist. Durch Stresssignale wird dieser Kreislauf unterbrochen, wobei die verschiedenen Signale unterschiedliche Wege für die Inhibition von MDM2 benutzen. Beispielsweise kann durch Phosphorylierung von p53 die Bindung von MDM2 unterbunden werden (Kussie et al., 1996) oder es wird durch p19Arf (siehe unten) eine räumliche Trennung zwischen p53 und MDM2 ausgelöst (Pomerantz et al., 1998; Stott et al., 1998).

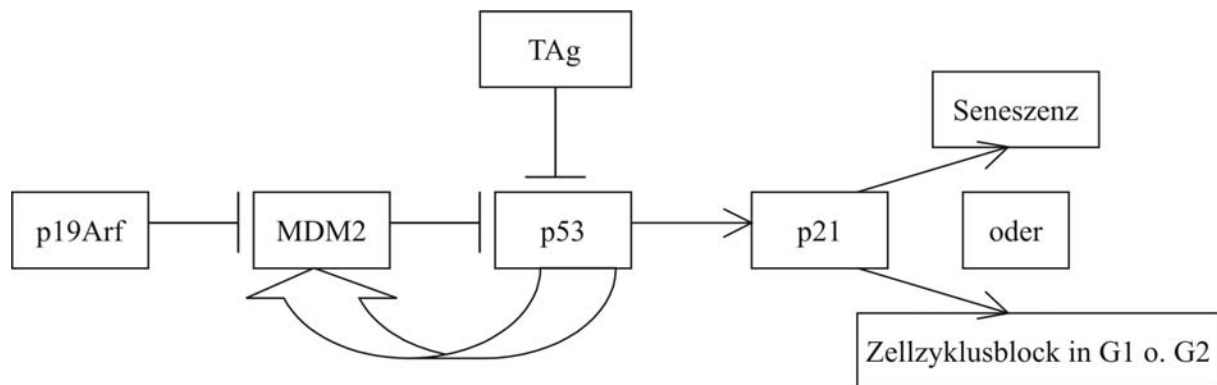


Abb. 2 p53 Signalweg

Schematische Darstellung der für die Tumorsuppression wichtigsten Prozesse des p53 Signalweges.

Stresssignale bewirken nicht nur eine geringere Ubiquitinylierung, sondern durch posttranslationale Modifikationen auch eine erhöhte Stabilität von p53 (Kastan et al., 1991). Hierdurch wird dessen transkriptionelle Aktivität erhöht, was eine Induzierung p53-abhängiger Gene nach sich zieht.

Welche Gene von p53 aktiviert werden hängt stark von der Zellart und/oder dem zellulären Kontext ab. Zu den Genen, die generell durch p53 induziert werden, gehört neben MDM2 auch p21 (Abb. 2). Dieses Protein inhibiert unter anderem die Kinaseaktivität der Cyclin/cdk-Komplexe und führt damit zu einem Zellzyklusblock (Harper et al., 1993). Weiterhin ist dieses p53 Zielgen auch an der Induktion der Seneszenz beteiligt, wobei hier seine Effektoren nicht bekannt sind (Chang et al., 2002).

### 1.3.3 Der CDKN2a Locus (p16Ink4a und p19Arf)

Ein weiterer wichtiger Spieler unter den Tumorsuppressoren ist der CDKN2A Locus. Dieser Locus kodiert für die zwei Proteine p16Ink4a und p19Arf (p14Arf im Menschen), die unterschiedliche erste Exons aber ein gemeinsames zweites Exon besitzen (Quelle et

al.,1995). Da p19Arf (Arf= alternative reading frame) in einem alternativen Leserahmen transkribiert wird, besitzen beide Proteine keinerlei Homologie zueinander.

Inzwischen konnten sowohl für p19Arf (Kamijo et al., 1997) als auch für p16Ink4a (Krimpenfort et al., 2001; Sharpless et al., 2001) spezifische „*knock-out*“ Mäuse generiert werden. Interessanterweise stellte sich dabei heraus, dass beide Proteine Tumorsuppressoren sind, die in die oben vorgestellten pRB- und p53 Wege eingreifen.

p19Arf ist in den p53 Weg involviert, während p16Ink4a auf den pRB Weg wirkt. p16Ink4a inhibiert cdk4/6, was zur Folge hat, dass diese Proteine nicht mehr pRB phosphorylieren können (Abb. 1). Somit bewirkt p16Ink4a indirekt die Aktivierung von pRB, wodurch der Zellzyklus in der G1 Phase blockiert wird (Übersicht in Sherr und Roberts, 1999).

p19Arf bindet im Kern an MDM2, woraufhin beide Proteine in den Nukleolus wandern. Durch diese räumliche Trennung von p53 und MDM2, wird die Degradation von p53 verhindert und somit der Tumorsuppressor aktiviert (Abb. 2) (Weber et al., 1999).

#### 1.4 Simian Virus 40 Large T Antigen (TAg)

Zur Etablierung von Zelllinien wird oft TAg verwendet. Isoliert wurde dieses Onkogen aus dem Simian Virus 40 (SV40), einem Mitglied der Polyomaviren. Das virale Genom des SV40 besteht aus einem zirkulären DNA-Doppelstrang und kodiert für die Hüllproteine VP1, VP2 und VP3 sowie für die T(umor) Antigene zu denen das Large T (TAg), das Small T und das 17K T Antigen gehören (Übersicht in Sullivan und Pipas, 2002).

TAg ist ein multifunktionelles Protein, dass fast während des gesamten Infektionsprozesses von SV40 benötigt wird. Unter anderem ist TAg ein sequenz-spezifisches DNA-bindendes Protein, welches die virale DNA Replikation initiiert. Dies geschieht durch Bindung und „Aufschmelzung“ des SV40 „origin of replication“ und durch die Rekrutierung des zellulären Replikationsapparates. Zusätzlich dient TAg während der Elongationsphase der DNA-Replikation als DNA Helikase. Darüber hinaus kann TAg auch Transkription von Genen sowohl aktivieren als auch reprimieren. Auch an der Assemblierung der SV40 Hüllproteine ist TAg beteiligt (Übersicht in Sullivan und Pipas, 2002).

All diese Funktionen von TAg werden aber nicht für die Immortalisierung benötigt. Vielmehr konnten drei voneinander unabhängige Domänen innerhalb von TAg lokalisiert werden, die hierfür zwingend notwendig sind (Zhu et al., 1992).

(1) Es konnte eine Region von TAg lokalisiert werden, welche für die Inaktivierung des pRBs zuständig ist (LxCxE Motiv) (Abb. 3) (Kaelin et al., 1990). Das pRB durchläuft während des Zellzyklusses verschiedene Phosphorylierungsstadien, wobei die hypophosphorylierte Form

die aktive ist. An diese aktive Form des pRB bindet TAg, wodurch es die inhibitorischen Effekte des pRBs unterbindet (Abb. 1) (Ludlow et al., 1989). Daraus folgt beispielsweise, dass E2F-1 und damit dessen Zielgene aktiviert werden und die Zellen somit in die S-Phase eintreten können.

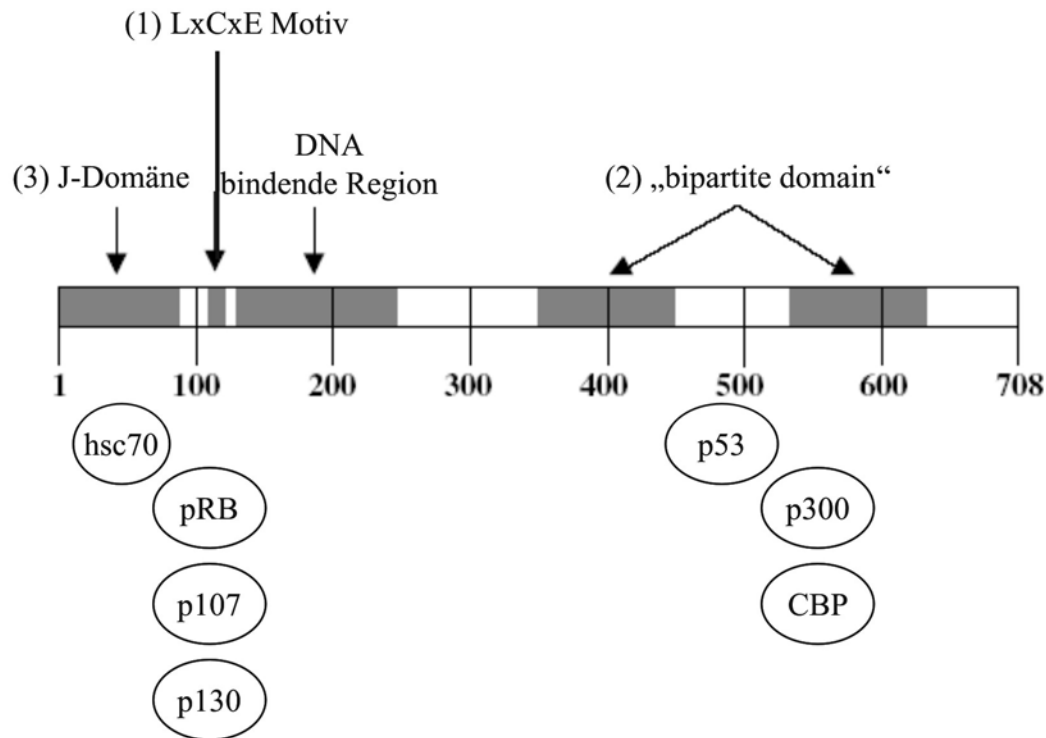


Abb. 3 Schematische Darstellung des TAg

TAg ist dargestellt als Balken, wobei die verschiedenen Domänen als graue Regionen eingezeichnet sind. Die Namen der Domänen sind oberhalb des Balkens angegeben, während unter dem Balken die Proteine eingezeichnet sind, die mit TAg beziehungsweise den entsprechenden Domänen interagieren.

Die Region des pRB, welche von TAg gebunden wird, wird „pocket domain“ genannt und ist in Tumoren mit inaktivierten pRB meist mutiert. Diese Mutationen verhindern, dass pRB den Wachstumsstopp induzieren kann (Hu et al., 1990). Da weiterhin durch eine mutierte „pocket domain“ auch die Interaktion von pRB und TAg blockiert wird, unterstreicht dies, dass TAg den Proliferationsarrest des pRB inhibiert.

An das LxCxE Motiv von TAg bindet aber nicht nur das pRB, sondern auch die anderen pRB Familienmitglieder p107 und p130 (Abb. 3). Allerdings ist nicht klar, ob diese Interaktionen ebenfalls für die Immortalisierung benötigt werden.

(2) Die zweite für die Immortalisierung essentielle Domäne von TAg, bindet den Tumorsuppressor p53. Diese Region wird „bipartite domain“ genannt und befindet sich im C-terminalen Bereich von TAg (Ruppert und Stillman, 1993). Auch andere Proteine wie die transkriptionellen Coaktivatoren p300 oder CBP können an diese Region binden (Abb. 3) (Yaciuk et al., 1991). Ob diese Interaktionen allerdings für die TAg-vermittelte Immortalisierung essentiell sind, konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden.

Weitgehend akzeptiert ist, dass TAg die DNA-bindende Domäne des p53 bindet und gleichzeitig das Protein stabilisiert. Trotz dieser Stabilisierung wird durch diese Interaktion die p53-vermittelte Transkription nahezu komplett blockiert. Hieraus folgt, dass p53 Zielgene nicht mehr aktiviert werden können (Abb. 2) (Mietz et al., 1992). Die Inaktivierung von p53 ist für das Virus essentiell, da so ein Proliferationsarrest oder Apoptose verhindert wird und das Virus dadurch seine Replikationsphase vollenden kann.

(3) Allerdings konnten Studien mit TAg Deletionsmutanten zeigen, dass die direkte Interaktion beider Proteine nicht ausreicht, um alle Effekte des TAg auf p53 zu erklären. Vielmehr existiert ein weiterer Mechanismus, der ohne die direkte Interaktion beider Proteine auskommt. In diesen ist die dritte Domäne involviert, die für die Immortalisierung mit TAg benötigt wird. Sie wird aufgrund der Homologie zu den Chaperonen der DnaJ-Familie „J-Domäne“ genannt und umfasst die Aminosäuren 1-82 des N-Terminus (Abb. 3) (Srinivasan et al., 1997). Der genaue Mechanismus, mit dem sie an der Immortalisierung beteiligt ist, ist nicht bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die „J-Domäne“ sowohl den inhibitorischen Effekt auf pRB (Zalvide et al., 1998) als auch auf p53 (Quartin et al., 1994) verstärkt. Da bisher noch kein zelluläres Ziel dieser Region ermittelt werden konnte, scheint ihre Funktion darin zu liegen, die anderen beiden Domänen zu unterstützen.

## **1.5 Methoden zur konditionalen Immortalisierung**

### **1.5.1 Hintergrund**

TAg hat -wie alle viralen Onkogene- einen großen Einfluss auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Dies führt dazu, dass Zelllinien mit einem aktiven Onkogen sich stark von Wildtypzellen hinsichtlich Transkriptom und Proteom unterscheiden. Somit eignen sich Zelllinien mit einem konstitutiv exprimierten Onkogen nur bedingt für Untersuchungen molekularer Prozesse, da das Onkogen beziehungsweise seine Effektoren in diese Prozesse interferieren könnten.

Verschiedene Ansätze hatten zum Ziel mit einer sogenannten konditionalen Immortalisierung diese Probleme zu umgehen. Hierfür wird ein regulierbares Onkogen benötigt, welches im aktivierten Zustand Zellen immortalisiert, während durch seine Inaktivierung ein Proliferationsarrest ausgelöst wird. Darüber hinaus sollte mit der Inaktivierung des Onkogens auch dessen Einfluss auf die Prozesse der Zelle stark zurückgehen, so dass sich dieser Zustand besser für Untersuchungen eignet. Im Folgenden werden die bisher bekannten regulierbaren Systeme vorgestellt.

### 1.5.2 Die temperatur-sensitive Mutante des TAg (tsTAg)

Die bekannteste und am meisten verbreitete Methode, um konditional immortalisierte Zelllinien zu etablieren, benutzt eine temperatur-sensitive Mutante des TAg (tsTAg). Vom tsTAg konnte gezeigt werden, dass es bei der permissiven Temperatur (33°C) vollständig aktiv ist und so eine Immortalisierung ermöglicht. Im Gegensatz dazu wird tsTAg durch Kultivierung bei der nicht permissiven Temperatur (39°C) inaktiviert. Diese Inaktivierung rührt von der Instabilität des tsTAg her und hat zur Folge, dass das Protein verstärkt degradiert wird und so die Immortalisierung revertiert wird (Tegtmeyer 1975).

Um tsTAg für die konditionale Immortalisierung primärer Zellen systematisch nutzen zu können, wurden verschiedene Werkzeuge entwickelt. Beispielsweise wurde tsTAg in einen retroviralen Vektor integriert. Dies gewährleistet einen effizienten Gentransfer sowie die Integration des Transgens in das Genom von proliferierenden primären Zellen (Jat und Sharp, 1989). Darüber hinaus sind auch verschiedene transgene Mauslinien hergestellt worden, die die Etablierung von Zelllinien aus raren oder nicht proliferierenden Zellarten ermöglicht (Jat et al., 1991; Oostendorp et al., 2002). Mit diesen Werkzeugen wurden eine Vielzahl von Zelllinien aus den unterschiedlichsten Zellarten etabliert, die für zahllose Studien verwendet wurden (Übersicht in Noble et al., 1995; Obinata 2001).

Während tsTAg bei der permissiven Temperatur sehr effizient immortalisiert, ist die Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 39°C problematisch. Hierdurch wird zwar der Einfluss des Onkogens auf die Zelle reduziert. Dafür hat wahrscheinlich die nicht permissive Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Physiologie der Zelle, so dass die Verwendung dieses System für viele Fragestellungen zweifelhaft ist. Darüber hinaus ist durch die Art der Regulation dieses System auf *in vitro* Versuche beschränkt. Eine weitere Limitation besteht darin, dass eine temperatur-sensitive Mutante nur für TAg beschrieben ist, und diese Methode bisher nicht auf andere Proteine übertragen werden konnte. Damit stellt dieses Verfahren keine generelle Methode dar.

### 1.5.3 Eliminierung des Immortalisierungsgens durch sequenzspezifische Rekombination

Um die Probleme von tsTAg zu umgehen, wurden konditionale Immortalisierungssysteme entwickelt, die auf Eliminierung des Onkogens durch sequenzspezifische Rekombination beruhen. Dies wird durch die Rekombinasen Cre (aus Bakteriophagen P1) beziehungsweise Flp (aus der Hefe *Saccharomyces cerevisia*) bewerkstelligt, welche unabhängig von endogenen Faktoren sind. Als weitere Komponente brauchen diese Systeme lediglich noch die

Rekombinase-Erkennungsstellen („sites“) loxP beziehungsweise FRT. Die Rekombinase bindet an die Erkennungsstellen und katalysiert die reversible Rekombination, wobei über die Orientierung der „sites“ unterschiedliche Rekombinationsereignisse wie Inversion oder Exzision ablaufen können (Abb. 4) (Übersicht in Nagy 2000).

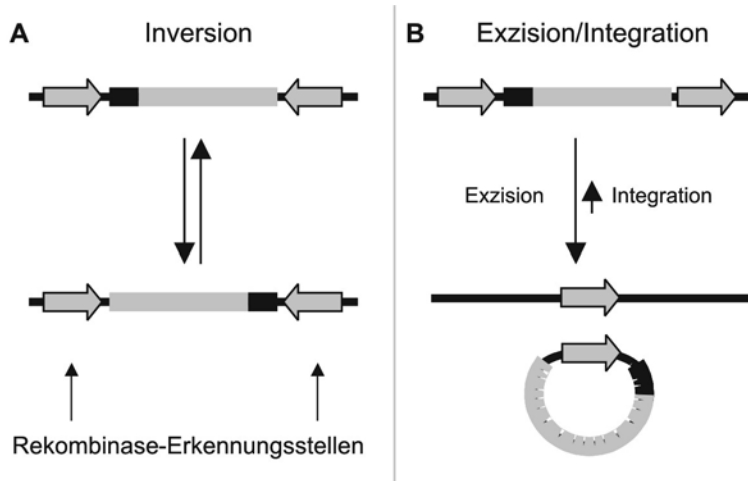


Abb. 4 (A) Die intramolekulare Rekombination zwischen invers orientierten Rekombinase-Erkennungsstellen führt zu einer Inversion der dazwischenliegenden DNA-Sequenz. (B) Bei gleicher Orientierung der Erkennungsstellen kommt es zur Exzision der dazwischenliegenden DNA-Sequenz und zur Bildung eines zirkulären DNA-Produktes. Der umgekehrte Weg, die Integration, verläuft weniger effizient als die Exzision.

Diese Technologie wird vor allem für die Generierung konditionaler „*knock-out*“ Mauslinien genutzt. Allerdings wurde dieses System auch für die konditionale Immortalisierung angewendet. Hierzu muss das Onkogen von zwei gleichgerichteten „sites“ flankiert und im Genom integriert sein. Durch konstitutive Expression des Transgens wird die Zelle immortalisiert. Eine Revertierung wird erreicht, indem zum gewünschten Zeitpunkt durch die Expression der Rekombinase das Onkogen exzidiert wird.

Um eine effiziente Exzision zu erreichen, wird Cre meist durch adenoviralen Transfer in die Zellen geschleust (Cai et al., 2000; Berghella et al., 1999; Rybkin et al., 2003). Dies führt zur Exzision und der damit verbundenen Inaktivierung des Onkogens. Alle Studien zeigten, dass durch diesen Schritt die Proliferation der Zellen verlangsamt oder gestoppt werden konnte. Gleichzeitig wurde hierdurch teilweise eine Differenzierung der Zellen ausgelöst (Berghella et al., 1999). Inwieweit die Immortalisierung durch Exzision des Onkogens auch auf molekularer Ebene revertiert werden kann, wurde bisher noch nicht untersucht.

Der Vorteil der sequenzspezifischen Rekombinationssysteme ist, dass sie durch die Exzision die komplette Inaktivierung des Onkogens bewirken und damit dessen Einfluss auf die Zelle. Allerdings ist dieser Schritt praktisch nicht revertierbar, so dass keine mehrfachen Regulationsprozesse möglich sind, wodurch dieses System sich für bestimmte Fragestellungen nicht eignet. Ein Problem der sequenzspezifischen Rekombinationssysteme



ist, dass für die Regulation zwei Gentransferschritte benötigt werden, von denen der zweite (die Transduktion der Rekombinase) sehr effizient sein muss. Wird die Rekombinase nicht in allen Zellen exprimiert, erfolgt die Exzision lediglich in einem Teil der Zellen. Dies führt zu einem Überwachsen der Zellen, bei denen die Rekombination nicht stattgefunden hat.

Eine ganz andere Strategie verfolgten Lasko und Kollegen. Sie generierten eine transgene Maus bei der TAG unter der Kontrolle des  $\alpha A$  crystallin Promotor stand. Dabei waren Promotor und Onkogen anfänglich durch eine Stopsequenz unterbrochen, welche von loxP-Stellen flankiert war. Somit führte die Cre Expression nicht zu einer Inaktivierung, sondern zur Aktivierung des Transgens (Lasko et al., 1992). Allerdings ist mit diesem Prinzip ein „Abschalten“ des Onkogens nicht möglich.

### 1.5.4 Transkriptionelle Regulation von Immortalisierungsgenen

Das Tetrazyklin-Resistenzsystem aus *E.coli* benutzten Gossen und Bujard (1992), um ein transkriptionelles Regulationssystem für Säugerzellen zu entwickeln. In diesem Resistenzsystem bindet der Tet-Repressor (TetR) als Dimer an die Sequenzen des Operators tetO und blockiert so die Transkription. Sobald Tetrazyklin in die Bakterien gelangt, wird es von den TetR-Dimeren gebunden. Hierauf folgt, dass diese ihre Konformation ändern und vom Operator dissoziieren (Müller et al., 1995). Damit wird die Expression der für die Tetrazyklinresistenz benötigten Gene aktiviert (Übersicht in Hillen und Berens 1994).

Das Tetrazyklin-Resistenzsystem wurde für die Verwendung in Säugerzellen adaptiert. Hierfür wurden zwei Komponenten entwickelt. Die erste ist der sogenannten Tet-abhängige Transaktivator (tTA), der aus einer Fusion zwischen dem Tet-Repressor und der transkriptionsaktivierenden Domäne VP16 des Herpes Simplex Virus besteht (Sadowski et al., 1988). Die zweite Komponente ist der Transaktivator-abhängige Promotor  $P_{hCMV^*-1}$ , eine Fusion aus sieben tetO-Sequenzwiederholungen und dem humanen CMV-Minimalpromotor  $P_{hCMVmin}$  (Boshart et al., 1985).

Die TetR-Domäne des Transaktivators bindet an die tetO-Sequenzen des Transaktivator-abhängigen Promotor, während die VP16-Domäne mit Hilfe von zellulären Transkriptionsfaktoren wie TFIIB (Lin et al., 1991), TBP (Ingles et al., 1991) oder TAFII<sub>40</sub> (Goodrich et al., 1993) die Transkription des Transgens aktiviert. Dies wird durch Zugabe von Tetrazyklin oder dessen Derivaten unterbunden, da das Antibiotikum an die TetR-Domäne des tTA bindet. Hierdurch wird eine Konformationsänderung ausgelöst, welche die Dissoziation des tTA von seinem Promotor bewirkt (Tet-off) (Abb. 5).

Der ursprüngliche Transaktivator tTA wurde hinsichtlich vieler Eigenschaften verändert. So wurden andere Aktivierungsdomänen verwendet, um eventuelle negative Effekte der VP16

Domäne zu verhindern (Urlinger et al., 2000a; Akagi et al., 2001). Weiterhin wurde für den effizienteren Kerntransport ein „nls“ (nuclear localisation signal) an den Transaktivator fusioniert, was sich in der Erhöhung der Induktion auswirkte (Yoshida und Hamada, 1997). Darüber hinaus sind auch sogenannte reverse Transaktivatoren entwickelt worden, die durch Tetrazyklin- oder Doxyzyklin-Zugabe an die tetO Sequenzen binden und somit die Genexpression aktivieren (rtTA; Tet-on) (Gossen et al., 1995).

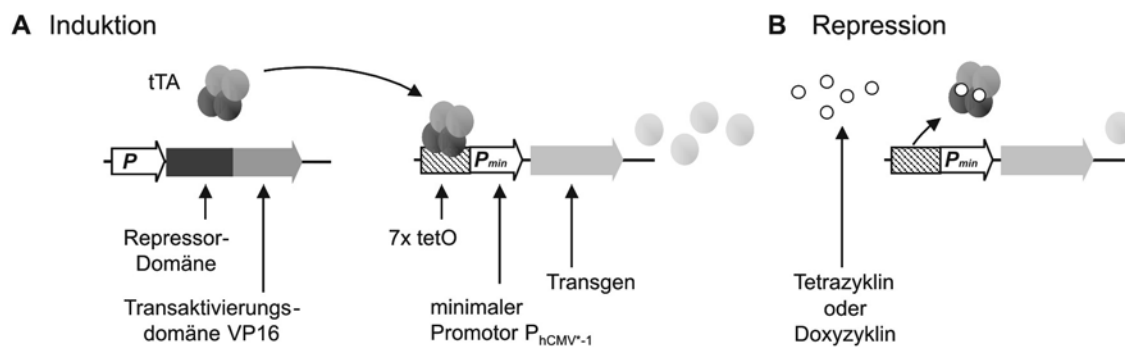


Abb. 5 Schematische Darstellung der transkriptionellen Regulation durch das Tet-System

Dargestellt ist der Regulationsprozess des „Tet-Off“ Systems. A) Der Transaktivator wird konstitutiv exprimiert und aktiviert die Transgenexpression vom Tet-abhängigen Promotor  $P_{hCMV^*-1}$ . B) Tetrazyklin oder Doxyzyklin binden nach deren Zugabe an den Transaktivator. Daraus folgt, dass der Transaktivator seine Konformation ändert und vom Tet-abhängigen Promotor dissoziiert. Dies zieht eine Reprimierung der Transgenexpression nach sich.

Das für pRITA verwendete „Tet-on“ System wird hingegen durch die Zugabe von Doxyzyklin oder Tetrazyklin induziert.

Inzwischen konnte auch in verschiedenen Tiermodellen eine regulierbare Transgenexpression mit Hilfe des Tet-Systems erreicht werden. Unter anderem wurde es auch für die Induktion von Tumoren benutzt. In der ersten Studie dieser Art wurde die Expression von TAG über den Transaktivator gesteuert. Im induzierten Zustand bildeten die Mäuse innerhalb kurzer Zeit (zwei Wochen) kleine Foci von transformierten Zellen, die sich nach längerer Induktion (vier Monaten) zu Tumoren bildeten. Erstaunlicherweise führte die Reprimierung von TAG nach vier Monaten zu einer kompletten Regression der Tumore. Erst nach längeren Induktionsphasen (sieben Monate) akquirierten die Zellen weitere Mutationen, wodurch die Tumore nicht mehr in ihrem Wachstum von TAG abhängig waren (Ewald et al., 1996).

Auch Studien mit anderen Onkogenen wie H-Ras<sup>V12G</sup> (Chin et al., 1999), c-myc (Felsher und Bishop, 1999) und BCR-ABL1 (Huettner et al., 2000) zeigten, dass die Aktivierung der Onkogene Tumorwachstum induziert. Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass mit der Reprimierung der Onkogene auch eine Regression der Tumore einherging.

Der Vorteil des Tet-Systems liegt darin, dass leicht eine homogene Regulation in allen Zellen ermöglicht wird, wobei diese Regulationszyklen auch mehrmals durchlaufen werden können. Problematisch bei dem Tet-System ist, dass sowohl der Transaktivator als auch das Transgen in einen genomischen Ort integrieren muss, der neben einer strikten Regulierbarkeit auch eine hohe Expression im aktiven Zustand erlaubt. Weiterhin sind für die Transduktion der beiden

Komponenten in der Regel zwei Gentransfers nötig. Dies ist bei Primärkulturen mit ihrem begrenzten Replikationslimit ein nahezu unmögliches Unterfangen. Durch einen Kotransfer beider Komponenten kann dieses Problem umgangen, wobei auch diese Prozedur bei primären Zellen sehr schwierig ist.

## 1.6 Aufgabenstellung

Für die Beantwortung vieler biologischer Fragestellungen werden Zelllinien benötigt. Dies trifft vor allem dann zu, wenn die molekularen Zusammenhänge eines Prozesses näher untersucht werden sollen. Zum Beispiel werden „*knock-out*“ Mäuse meist erst phänotypisch charakterisiert, ehe nachfolgend die dafür verantwortlichen molekularen Ursachen im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen.

Da aber eine Immortalisierung starken Einfluss auf die Physiologie der Zelle nimmt, sind für solche Analysen Zelllinien die Methode der Wahl, in denen die Immortalisierung revertiert werden kann. Daher war es Ziel dieser Arbeit ein System für die konditionale Immortalisierung zu entwickeln. Das System sollte mehrere Bedingungen erfüllen. Erstens muss es einfach regulierbar sein, wobei die Regulation möglichst homogen in allen Zellen verlaufen sollte. Zweitens sollte das System eine stringente Regulation mit möglichst hohen Induktionsfaktoren ermöglichen. Drittens sollte der Regulationsschritt die Zellen möglichst nicht beeinflussen. Viertens muss das System mit einem Gentransferschritt in die Zellen transduzierbar sein, was aufgrund der kurzen Proliferationsphase primärer muriner Zellen wichtig ist. Fünftens sollte es modular aufgebaut sein, um einen leichten Austausch der Komponenten zu ermöglichen.

Von Unsinger und Kollegen (2001) wurde ein autoreguliertes Tet-System entwickelt, welches die genannten Kriterien erfüllt. Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit ein System für die konditionale Immortalisierung entwickelt und anschließend die damit etablierten Zelllinien auf zellulärer und molekularer Ebene charakterisiert.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Entwicklung eines Plasmidvektors zur konditionalen Immortalisierung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode, welche die konditionale Immortalisierung von murinen Zellen ermöglicht. Hierfür wurde als Basis ein autoregulierter auf dem Tet-System basierender Vektor ausgewählt, der strikt regulierte Genexpression vermittelt. Unter anderem wurde mittels dieses Systems eine tausendfache Regulation der Luziferaseexpression erreicht (Unsinger et al., 2001). Sowohl die hohen Regulationsfaktoren als auch die Tatsache, dass sich alle für eine konditionale Genexpression benötigten Komponenten auf einem Plasmid befinden, machen diesen Vektoraufbau auch für die reversible Immortalisierung attraktiv.

Der im Rahmen der Arbeit entwickelte Tet-abhängige, autoregulierte Immortalisierungsvektor pRITA (Reversible Immortalisierung mittels TAg) basiert auf dem bidirektionalem Tet-abhängigem Promotor (Baron et al., 1995). Von diesem Promotor wird die Expression von zwei Transkripten initiiert. Das Erste kodiert für den reversen Transaktivator rtTA2M2 (Tet-on) (Urlinger et al., 2000) und für das Fusionsprotein eGFP/Neo, welches als Reporter- (eGFP) und Selektionsgen (Neo) dient. Das zweite Transkript kodiert für das Simian Virus 40 Large T Antigen (TAg) (Abb. 6). Dieses virale Onkogen inaktiviert die Tumorsuppressoren p53 und pRB (Kap. 1.4) und immortalisiert daher sehr effizient primäre murine Zellen.



Abb. 6 Schematische Darstellung des Vektors pRITA

Der Tet-abhängige Promotor initiiert 2 mRNAs. Die eine kodiert für TAg, die andere ist bicistronisch und kodiert für den reversen Transaktivator. Über das EMCV-Ires wird die Translation des Fusionsprotein eGFP/Neo gewährleistet.

Die Aktivierung des Systems erfolgt über Doxyzyklin (Dox) Zugabe zum Medium. Dox bindet an den Transaktivator, der dadurch seine Konformation ändert und über den Tet-abhängigen Promotor rekombinante Genexpression aktivieren kann. Der Aufbau von pRITA führt dazu, dass der Transaktivator seine eigene Transkription steuert, was zu einem positivem Rückkoppelungsmechanismus führt. Zur gleichen Zeit werden auch eGFP/Neo und TAg exprimiert.

Um die Funktionalität des Vektors zu überprüfen, wurde er in murine embryonale Fibroblasten (MEF) mittels Calciumphosphat-Transfektion stabil integriert, wobei zuvor mit einer transienten Transfektion die Effizienz dieses Prozesses ermittelt wurde. Hierfür wurden

die Zellen zwei Tage nach Transfektion mittels FACS auf eGFP-Expression analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Transfektionseffizienz von Charge und Passage der MEF abhängig war und zwischen 0 %-5 % schwankte (Daten nicht gezeigt).

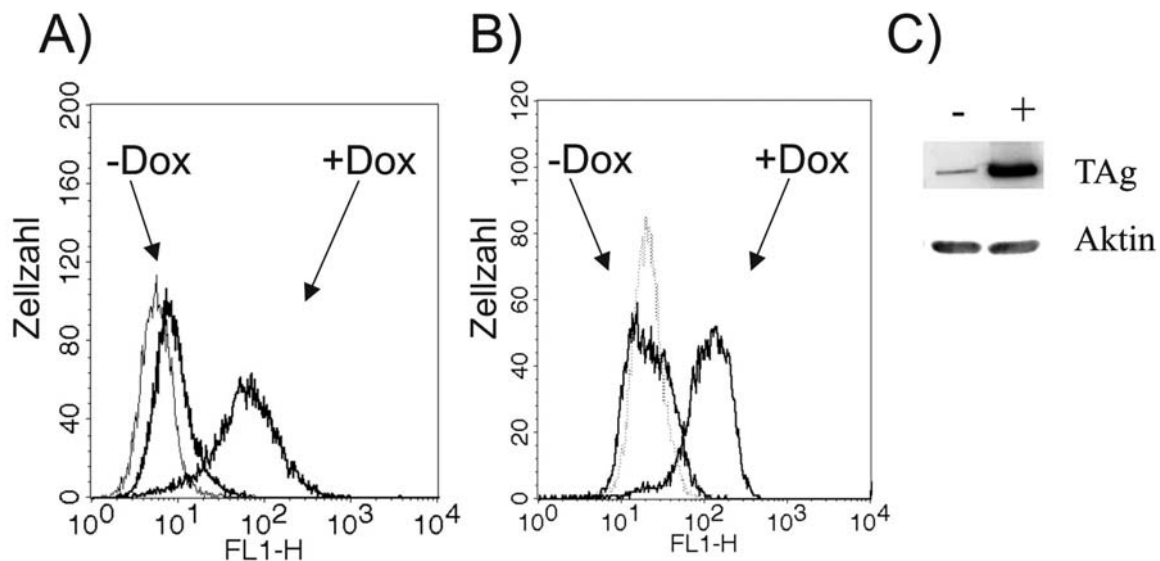


Abb. 7 Regulationspotential von pRITA

Die repräsentative Zelllinie MBa10 wurde drei Tage mit und ohne Dox kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen, trypsiniert, und anschließend analysiert. A) GFP-Analyse. Mittels Propidiumiodid-Färbung wurden tote Zellen von der Analyse ausgeschlossen. (Kontrolle Balb/c 3T3, dünne Linie; MBa10 Zellen dicke Linien); B) Intrazelluläre Färbung von TAg. Es wurde ein Färbeprotokoll ohne Fixier- und Waschschritte verwendet, da dies zu einer vergleichbaren Hintergrundfluoreszenz bei an- und abgeschalteten Zellen führte. Nach Permeabilisierung wurden die Zellen mit ersten und zweiten Antikörper inkubiert, bevor sie im FACS analysiert wurden. (Kontrolle zweiter Antikörper allein, dünne Linie; MBa10 Zellen dicke Linien); C) Western Blot Analyse von TAg. Das Zellpellet wurde in Zellaufschlusspuffer resuspendiert und der Proteingehalt mittels eines Bradfordassays bestimmt. Jeweils 30 µg Protein wurden aufgetragen, als Ladekontrolle diente Aktin. „+“ und „-“ steht für an- beziehungsweise abgeschaltete MBa10 Zellen.

Insgesamt wurden nach Selektion mit G418 im aktivierten Zustand (+Dox) zehn unabhängige konditional immortalisierte Zelllinien generiert. Dieser Immortalisierungsprozess war nicht sehr effizient, da durchschnittlich nur eine Zelllinie pro  $1 \cdot 10^6$  transfizierten Zellen etabliert wurde. Zunächst wurde das Regulationspotential analysiert. Dazu wurden die Zellen mit und ohne Dox kultiviert (Abb. 7; gezeigt ist der repräsentative Klon MBa10), wobei sich zeigte, dass sowohl eGFP (Abb. 7 A) als auch TAg (Abb. 7 B,C) Dox-abhängig exprimiert werden. Im reprimierten Zustand wurde bei beiden rekombinanten Proteinen eine niedrige Expression beobachtet. Dies kann damit erklärt werden, dass für den Start des autoregulierten Systems eine niedrige Expression des Transaktivators im abgeschalteten Zustand nötig ist. Durch Dox-Zugabe wird dieser aktiviert und startet anschließend die Transgenexpression.

Nachfolgend wurde die Proliferation der Zellen im an- und abgeschalteten Zustand untersucht. Es sollte untersucht werden, ob die Expressionshöhe von TAg im aktivierten Zustand für eine Immortalisierung ausreicht und ob sie im reprimierten Zustand niedrig genug für eine komplette Revertierung der Immortalisierung ist. Die aktivierten Zellen (+Dox) zeigten ein exponentielles Wachstumsverhalten, wohingegen die Zellzahl im reprimierten Zustand (-Dox) mindestens über 14 Tage lang konstant blieb (Abb. 8 A). Ein

Koloniebildungsassay bestätigte das Dox-abhängige Wachstum. Ohne Dox entstanden keine Kolonien, während sich mit Dox mehr als 100 Kolonien bildeten (Abb. 8 B). Dies bedeutet, dass die Basalexpression im abgeschalteten Zustand zu gering ist, um Proliferation zu induzieren.

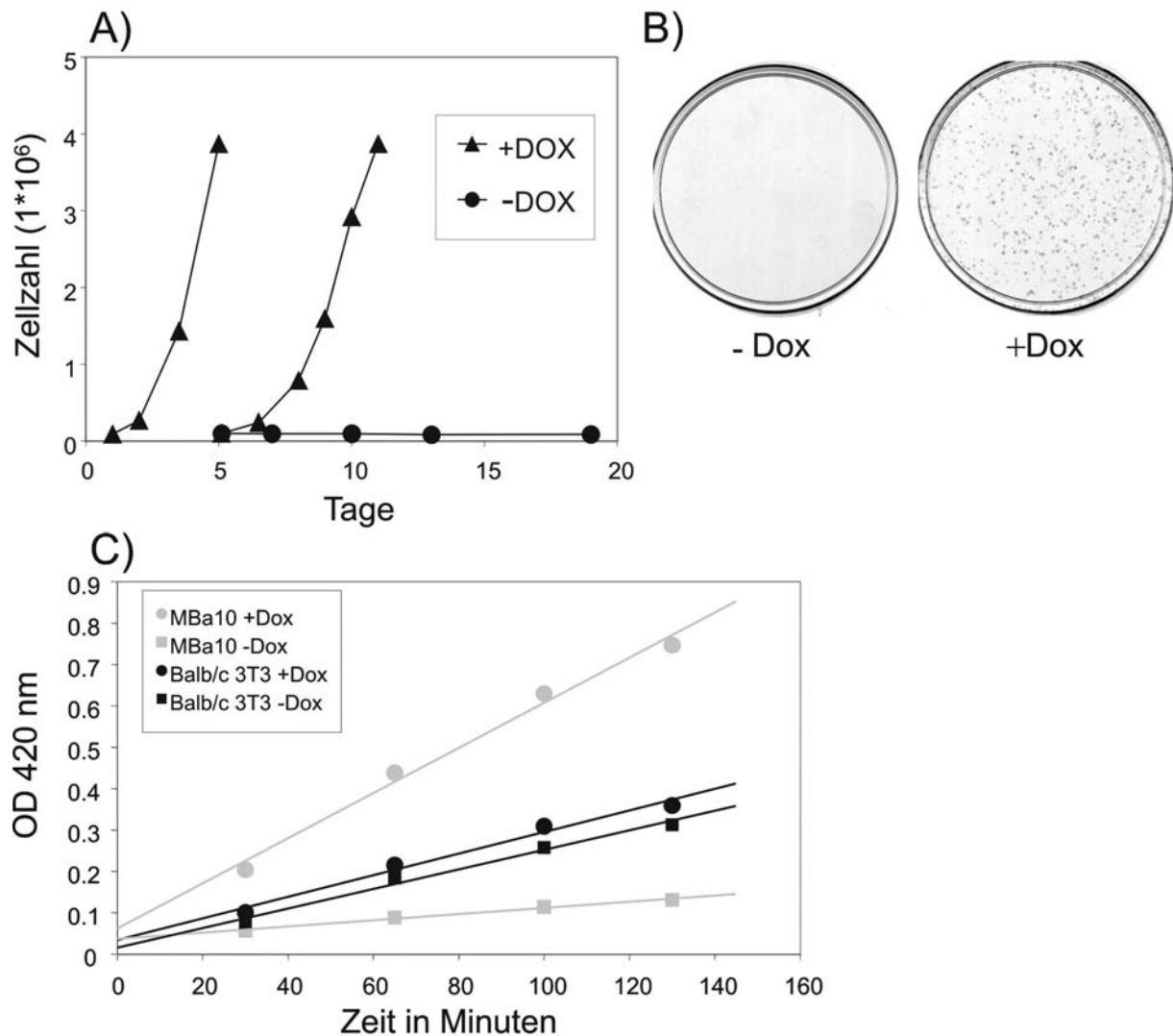


Abb.8 Proliferationsverhalten konditional immortalisierter Zellen in Abhängigkeit von Dox

A) Die Zellzahl eines repräsentativen Zellklons MBa10 wurde nach Kultivierung mit (Dreiecke) und ohne Dox (Kreise) bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Kulturen. B)  $1 \cdot 10^3$  Zellen wurden auf eine  $55 \text{ cm}^2$  Zellkulturplatte ausplattiert und für zwei Wochen mit und ohne Dox kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt. C) MBa10 und Balb/c 3T3 Zellen wurden mit und ohne Dox kultiviert. Dazu wurden  $1 \cdot 10^3$  Zellen in eine  $0,9 \text{ cm}^2$  Platte ausgesät und für eine Woche kultiviert, wobei am vierten Tag das Medium erneuert wurde. Am siebten Tag wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase mittels eines WST Assays (Roche Diagnostics) über die Absorptionsänderung bei 420 nm bestimmt.

Von den zehn mit pRITA-etablierten Zelllinien zeigten neben dem Klon MBa10 sechs weitere diese strikte Proliferationskontrolle. Die Kultivierungsdauer beeinflusste nicht das Regulationsverhalten dieser Zellen, da diese auch nach sechsmonatiger Kultur striktes, Dox-regulierbares Wachstum aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Die anderen drei generierten Zelllinien konnten auch mit Dox reguliert werden, allerdings in einem geringeren Ausmaß, da auch im reprimierten Zustand Wachstum detektiert wurde.

Die Propidiumiodid-Färbung zeigte, dass im an- und abgeschalteten Zustand der Prozentsatz der toten Zellen gering ist (2-5% tote Zellen; Daten nicht gezeigt). Somit sind die reprimierten Zellen nicht apoptotisch oder nekrotisch, sondern nur in ihrer Proliferation blockiert. Wie dieses Resultat ebenfalls zeigt, wird die Transaktivatorexpression von den Zellen gut toleriert. Neben den pRITA-immortalisierten Zellen wurde auch eine spontan immortalisierte Zelllinie mit Hilfe des 3T3 Protokolls etabliert (Balb/c 3T3) (Todaro und Green, 1963). Diese Zellen wurden genutzt, um zu überprüfen, ob Dox unspezifische Effekte bezüglich des Zellwachstums hervorruft. Hierzu wurden die Balb/c 3T3 Zellen mit und ohne Dox kultiviert, wobei sich zeigte, dass die verwendete Dox-Konzentration keinen Einfluss auf die Proliferation der Balb/c 3T3 Zellen hat (Abb. 8 C).

Somit kann die strikte Proliferationskontrolle der pRITA-Zellen allein dem transkriptionell regulierten TAg zugeschrieben werden.

### 2.1.1 Einfluss der Dox-Konzentration auf die Expression

Das klassische, binäre Tet-System erlaubt durch eine stufenweise Anhebung der Dox-Konzentration eine graduelle Erhöhung der rekombinanten Genexpression (Gossen und Bujard, 1992). Daher sollte untersucht werden, ob der autoregulierte Vektor pRITA dies auch ermöglicht. Dazu wurde die Proliferationsrate von MBa10 Zellen bei verschiedenen Dox-Konzentrationen gemessen (Abb. 9).

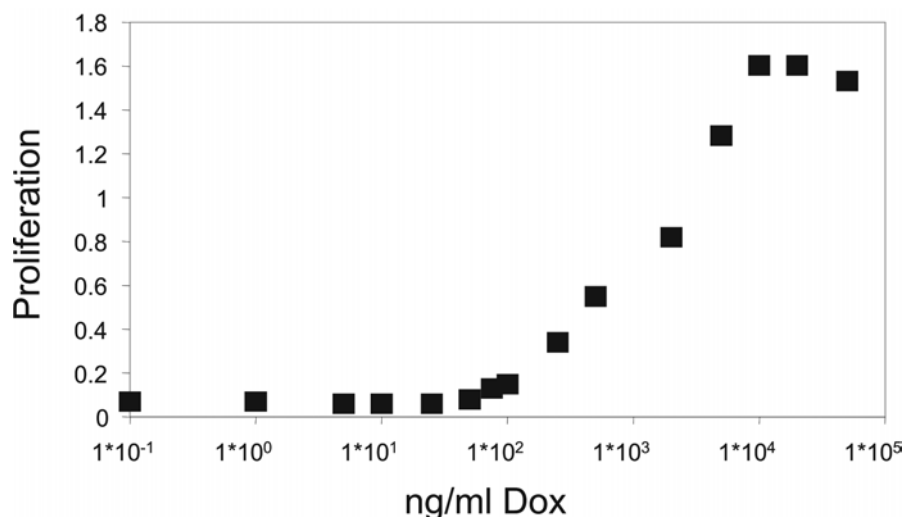


Abb. 9 Abhängigkeit zwischen Proliferation und Dox-Konzentration

1\*10<sup>3</sup> MBa10 Zellen wurden pro 0,9 cm<sup>2</sup> Platte ausgesät und für sieben Tage mit den entsprechenden Dox-Konzentrationen kultiviert, wobei am vierten Tag das Medium erneuert wurde. Am siebten Tag wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase mittels eines WST Assays (Roche Diagnostics) bestimmt und gegen die Dox-Konzentration aufgetragen (Details siehe Material und Methoden).

Deutlich wurde eine sigmoide Abhängigkeit zwischen Proliferation und der Dox-Konzentration, wobei eine weitgehend lineare Abhängigkeit zwischen 100 ng/ml und 10 mg/ml vorlag. Hingegen erreichte die Wachstumsgeschwindigkeit bei Dox-

Konzentrationen über 10 mg/ml ein Plateau, während unter 100 ng/ml kein signifikantes Zellwachstum festgestellt wurde.

Die eGFP-Fluoreszenz wurde bei unterschiedlichen Dox-Konzentrationen mittels FACS analysiert (Abb. 10). Diese Methode ermöglicht es die Expressionshöhe, welche durch die autoregulierte Kasette vermittelt wird, pro Zelle zu bestimmen. Dabei wurde unerwarteterweise deutlich, dass die Erhöhung der Dox-Konzentration keinen graduellen Anstieg der Transgenexpression bewirkte. Vielmehr entstand bei niedrigen Dox-Konzentrationen eine eGFP-negative und eine eGFP-positive Zellpopulation. Die Erhöhung der Konzentration bewirkte, dass ein höherer Prozentsatz der Zellen eGFP positiv wurde und damit tatsächlich aktiviert war.

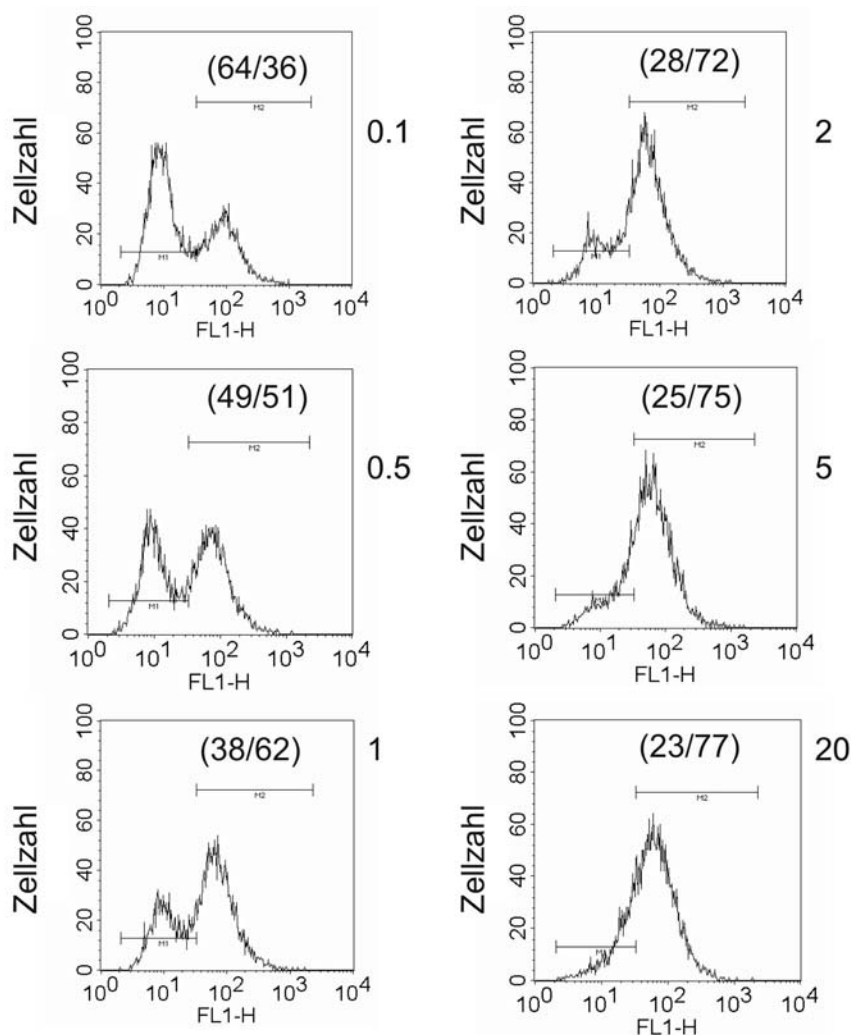


Abb. 10 Abhängigkeit zwischen Dox-Konzentration und eGFP-Expression.

2 MBa10 Zellen wurden für fünf Tage mit den angegebenen Dox-Konzentrationen (rechts neben den Kästchen; Angabe in µg/ml) kultiviert. Anschließend wurden sie gewaschen, typsinisiert und mittels FACS analysiert. Propidiumiodid Färbung wurde genutzt, um tote Zellen von der Analyse auszuschließen. Die Zahlen in den Klammern geben den Prozentsatz der Zellen an, der in die angezeigten Regionen fällt.

Daraus kann man schließen, dass die sigmoide Abhängigkeit zwischen Proliferation und Dox-Konzentration aus einem steigenden Anteil wachsender Zellen resultiert, nicht aber von kontinuierlich schneller wachsenden Zellen. Wie diese Daten zeigen ist das autoregulierte System entweder an- oder ausgeschaltet und führt nicht zu einer graduellen Expressionssteigerung. Das steht im Gegensatz zu den publizierten Daten, die mit dem



binären System erhalten wurden (Gossen und Bujard, 1992; Urlinger et al., 2000; Bornkamm persönliche Kommunikation). Das binäre System führt zu einer Aktivierung aller Zellen, wobei über die Dox-Konzentration die Stärke der Aktivierung reguliert wird. Somit ist dies ein wesentlicher Unterschied zwischen autoregulierten und binären Tet-System. Dies wird in Kapitel 3.1.1 weiter diskutiert.

## 2.2 Vergleich von temperatur-sensitiven TAg mit transkriptionell reguliertem TAg

### 2.2.1 Vergleich der Regulationspotentiale der beiden konditionalen Immortalisierungsmethoden

Wie in der Einleitung bereits beschrieben (Kapitel 1.5.2), gibt es eine temperatur-sensitive Mutante des TAg (tsTAg), die bei der permissiven Temperatur (32°C) Zellen zur Proliferation anregt und damit immortalisiert. Hingegen führt eine Kultivierung der Zellen bei der nicht permissiven Temperatur (39°C) zur Reversion der Immortalisierung (Tegtmeyer 1975). Obwohl die Isolierung der Mutante rund 30 Jahre zurückliegt, wird gewöhnlicherweise immer noch tsTAg für die Etablierung konditional immortalisierter Zelllinien verwendet (Noble et al., 1995; Obinata 2001). Daher sollte die Methode der transkriptionellen Regulation von TAg des Vektors pRITA mit dieser Standardmethode verglichen werden.

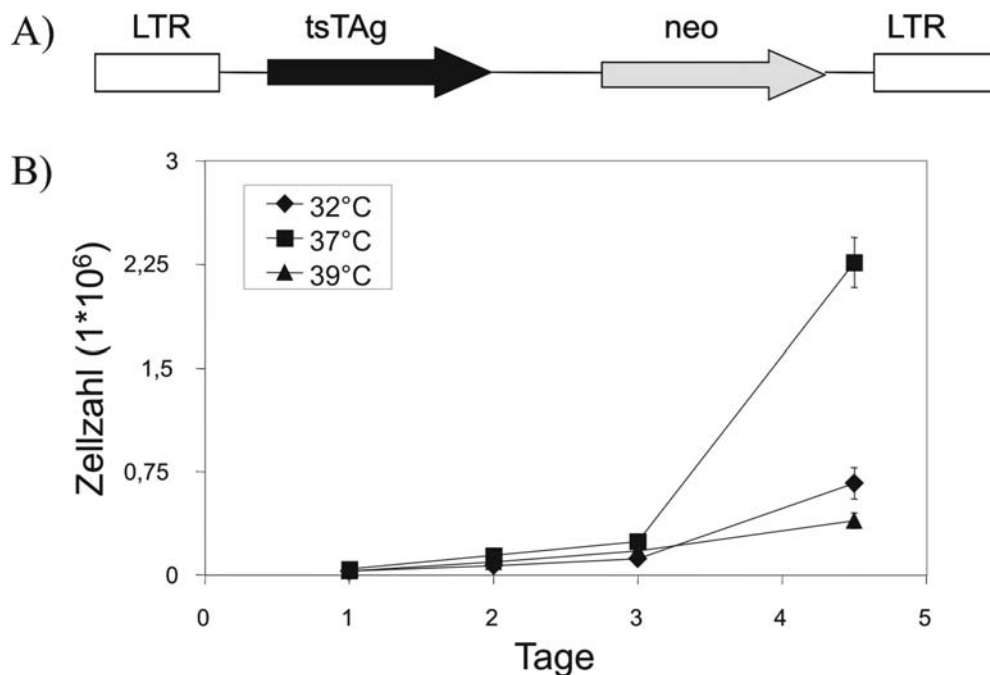


Abb. 11 Wachstum der temperatur-sensitiven Zelllinie MtsLT2

A) Schematischer Aufbau des retroviralen Vektors (Jat und Sharp, 1989). Der konstitutive Promoter des LTR initiiert die Expression des tsTAg und des Selektionsgens Neo. B) Wachstumskurve einer repräsentativen Zelllinie (MtsLT2) bei den Temperaturen 32°C, 37°C und 39°C. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Kulturen.

Entsprechend des publizierten Protokolls (Jat und Sharp, 1989), wurde tsTAg mittels retroviraler Infektion in MEF integriert (Abb. 11 A). Es wurden acht immortalisierte Klone isoliert und bezüglich ihres temperatur-abhängigen Wachstums untersucht. Dazu wurden die Zellen bei 32°C (permissive Temperatur; tsTAg aktiv), 37°C (Standardtemperatur in der Zellkultur) und 39°C (nicht permissive Temperatur; tsTAg inaktiv) kultiviert. In Abbildung 11 B sind die Resultate eines repräsentativen Klons (MtsLT2) dargestellt. Bei 32°C und 37°C zeigten die Zellen exponentielles Wachstum, wobei die Zellen bei 32°C langsamer wuchsen. Im Gegensatz dazu ist die Proliferation bei 39°C reduziert und gibt damit ein Indiz für die Funktionalität von tsTAg.

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurde der Proteinlevel von tsTAg bei den unterschiedlichen Temperaturen untersucht (Abb. 12 A). Dabei zeigte sich, dass mit steigender Temperatur der tsTAg-Gehalt abnahm. Die höchste Konzentration wurde bei 32°C gemessen. Bei 37°C verringerte sich der TAg-Level verglichen mit dem bei 32°C um 37 % beziehungsweise um 60 % bei 39°C.

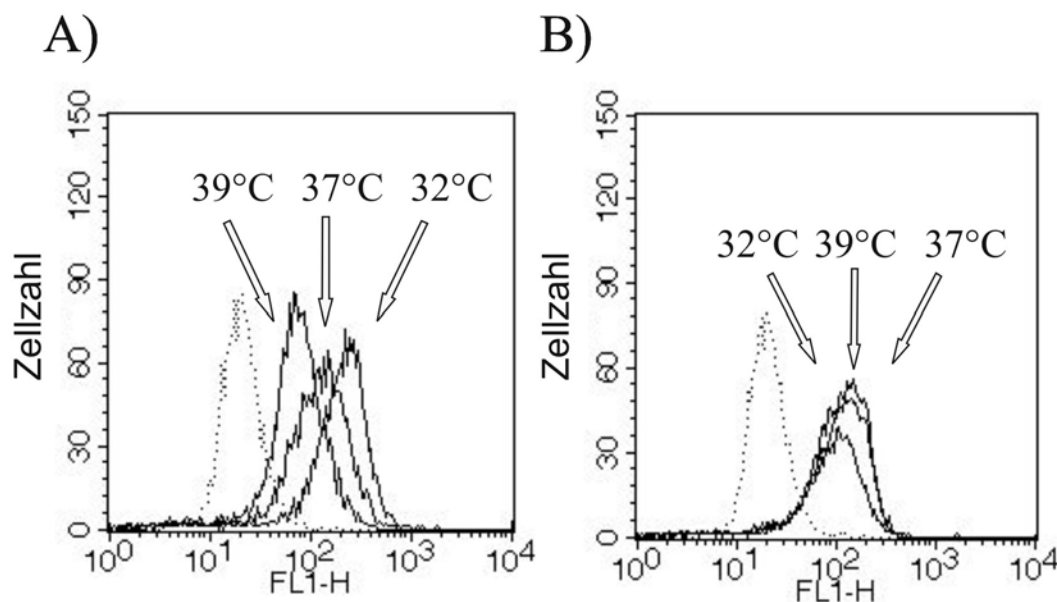


Abb. 12 Intrazelluläres Färben von TAg

Die Zellen wurden für drei Tage bei den entsprechenden Bedingungen kultiviert. Für die Färbung wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und permeabilisiert. Nach Zugabe des ersten und zweiten Antikörpers wurden die Zellen im FACS vermessen. A) MtsLT2 bei 32°C, 37°C, 39°C; B) MBa10 +Dox bei 32°C, 37°C, 39°C. Als Kontrolle dienten Zellen, die allein mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurden (gepunktete Linie A und B).

Der Vergleich der beiden Systeme setzt ähnlich hohe TAg-Konzentrationen in den zu vergleichenden Zelllinien voraus. Deswegen wurden auch pRITA-immortalisierte Zellen bei 32°C, 37°C und 39°C im aktivierten Zustand kultiviert und nachfolgend der TAg Gehalt bestimmt (Abb. 12 B). Hierbei stellte sich heraus, dass beide Systeme zu einer vergleichbaren TAg-Konzentration führen (Vgl. Abb. 12 A und B) und die Temperatur keinen Einfluss auf den Level des wtTAg hat.

Obwohl bei 39°C tsTAG exprimiert wird, weisen die Zellen weitgehend keine Proliferation auf. Dies dürfte darin begründet liegen, dass die Inaktivierung dieser Mutante erst auf Proteinebene durch erhöhte Instabilität oder Degradation stattfindet. Interessanterweise korreliert aber das Wachstum der tsTAG Zelllinie bei 37°C nicht mit dem tsTAG Proteinlevel (Vgl. Abb. 11 mit 12). Außerdem ist bei 32°C trotz der höchsten tsTAG-Konzentration die Proliferation verglichen mit der bei 37°C gering. Daher scheint neben tsTAG die Kultivierungstemperatur einen erheblichen Einfluss auf die Proliferation zu haben.

### 2.2.2 Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Wachstumseigenschaften

Säugerzelllinien werden standardmäßig bei 37°C kultiviert. Jede davon abweichende Temperatur ist vermutlich suboptimal. Daher sollte überprüft werden, ob die für die Inaktivierung des tsTAG notwendigen Kultivierungsbedingungen bereits die Proliferation beeinflussen. Hierzu wurden weitere Zelllinien bei 32°C, 37°C und 39°C bezüglich ihrer Proliferation untersucht. Zum einen wurden pRITA-immortalisierte Zelllinien verwendet, da ihr TAG-Level temperaturunabhängig ist (siehe Abb. 12 B). Zusätzlich wurde eine spontan immortalisierte Fibroblasten Zelllinie (Balb/c 3T3) analysiert, um TAG-spezifische Effekte bei dieser Untersuchung ausschließen zu können.

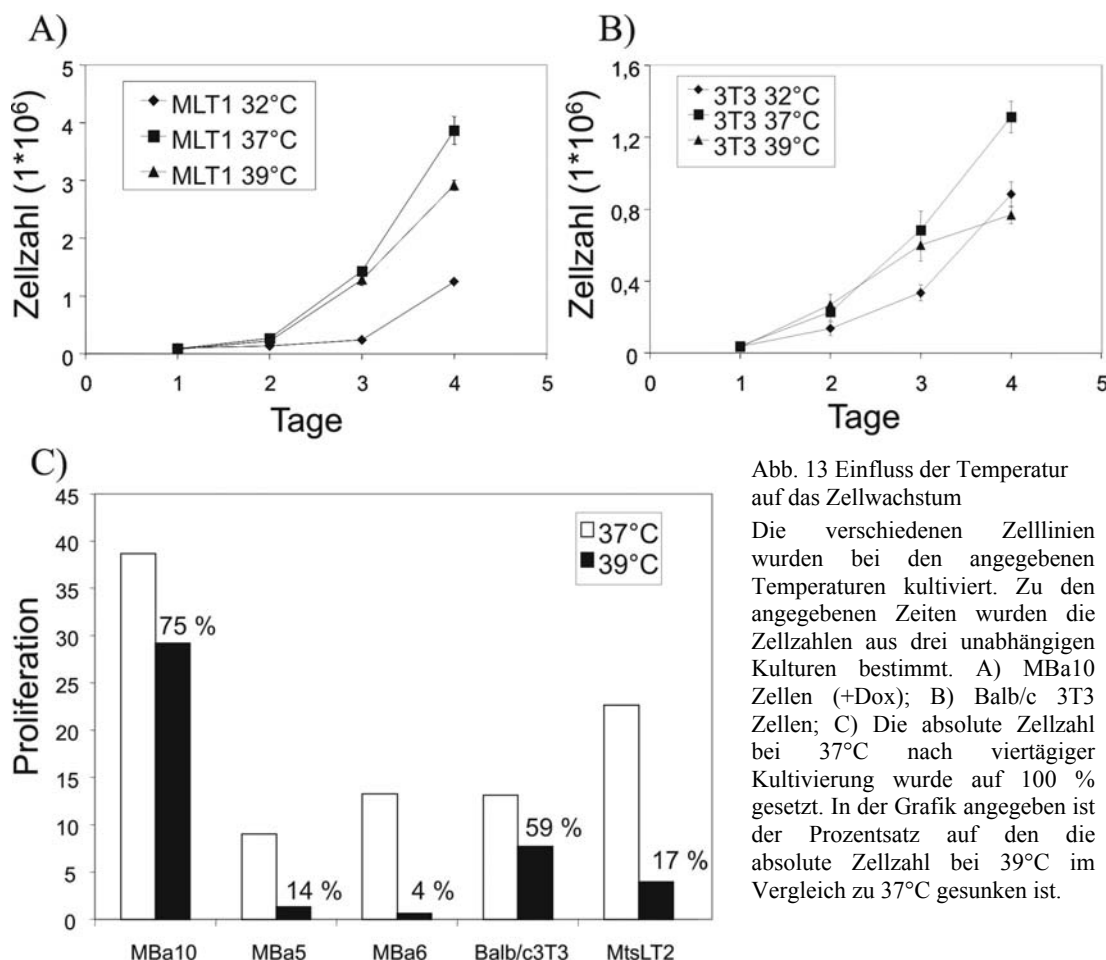


Abb. 13 Einfluss der Temperatur auf das Zellwachstum

Die verschiedenen Zelllinien wurden bei den angegebenen Temperaturen kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellzahlen aus drei unabhängigen Kulturen bestimmt. A) MBa10 Zellen (+Dox); B) Balb/c 3T3 Zellen; C) Die absolute Zellzahl bei 37°C nach vier tägiger Kultivierung wurde auf 100 % gesetzt. In der Grafik angegeben ist der Prozentsatz auf den die absolute Zellzahl bei 39°C im Vergleich zu 37°C gesunken ist.

Bei aktivierten MBa10 Zellen wurde das erwartete Proliferationsverhalten beobachtet. Die Zellen zeigten bei 37°C und 39°C ein vergleichbares exponentielles Wachstum. Eine Kultivierungstemperatur von 32°C führte dagegen zu einer stark verlangsamten Proliferation (Abb. 13 A). Auch die Analyse von Balb/c 3T3 Zellen ergab, dass 37°C optimales Zellwachstum ermöglicht, während dieses bei 32°C stark reduziert ist. Dies dürfte vermutlich aus der bei dieser Temperatur geringeren metabolischen Aktivität der Zellen resultieren. Hingegen wurde bei 39°C ein verlangsamtes Wachstum ab dem dritten Tag beobachtet. Folglich scheint eine längere Kultivierung bei 39°C nicht gut toleriert zu werden (Abb. 13 B). Eine Erklärung hierfür ist, dass durch diese Temperatur ein leichter Hitzeschock ausgelöst wird, der nicht dauerhaft von den Zellen vertragen wird. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf die unterschiedlichen Immortalisierungsmethoden oder auf klonale Variation zurückzuführen ist, wurden weitere pRITA-immortalisierte Zelllinien untersucht. Diese wiesen bei 37°C ebenfalls exponentielles Wachstum auf, während eine Kultivierungstemperatur von 39°C ihr Wachstum stark beeinträchtigte (Abb. 13 C). Somit bestätigten diese Experimente, dass die Unterschiede im Wachstumsverhalten bei 39°C klonalen Ursprungs sind.

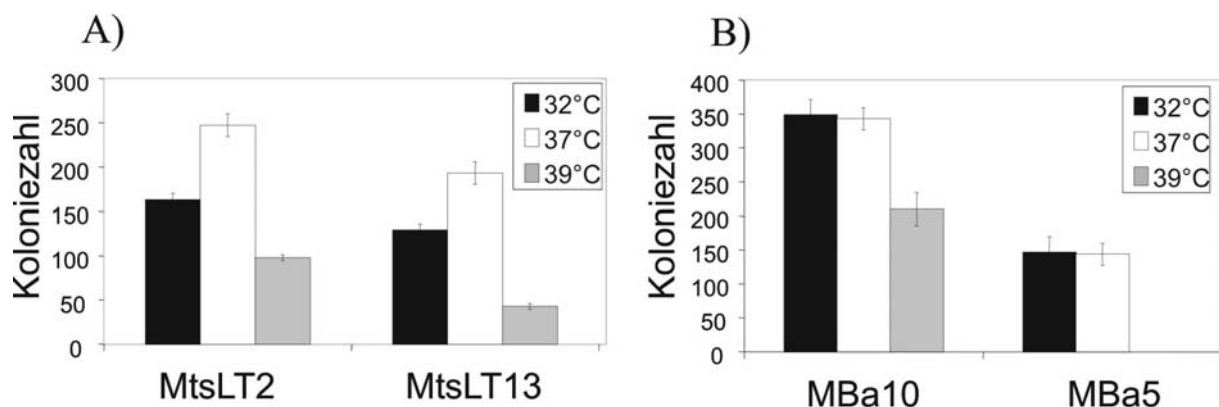


Abb. 14 Einfluss der Temperatur auf die Klonogenizität  
 $1 \cdot 10^3$  Zellen wurden auf eine 55 cm<sup>2</sup> Platte ausgesät und bei den angegebenen Temperaturen kultiviert. Die entstehenden Kolonien (bei 37°C und 39°C nach zwei Wochen, bei 32°C nach drei Wochen) wurden mit Crystal Violet angefärbt und ausgezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Kulturen. A) MtsLT2/13 bei 32°C, 37°C, 39°C; B) MBa5/10 (+Dox) bei 32°C, 37°C, 39°C.

Zur weiteren Charakterisierung wurden tsTag- und pRITA-immortalisierte Zelllinien in niedriger Zelldichte ausgesät und bei den verschiedenen Temperaturen kultiviert. Nach einer Wachstumsphase von zwei bis drei Wochen wurden die entstehenden Kolonien gezählt (Klonogenizität)(Abb. 14). Damit wurde die Temperaturabhängigkeit der Proliferation unter diesen Bedingungen untersucht. Die Klonogenizität der tsTag-immortalisierten Zelllinien war bei 39°C (nicht permissive Temperatur), wie erwartet am niedrigsten. Unerwarteterweise war die Koloniebildung aber bei 37°C deutlich gegenüber der bei 32°C erhöht (Abb. 14 A).

Dies deutet erneut daraufhin, dass das Wachstum dieser Zellen sowohl von tsTAg als auch von der Temperatur abhängig ist.

Die pRITA-immortalisierten Zelllinien MBa5 und MBa10 wiesen keinen Unterschied in der Klonogenizität bei 32°C und 37°C auf. Eine Kultivierungstemperatur von 39°C hatte hingegen einen negativen Einfluss auf die Koloniebildung (Abb. 14 B). Besonders tritt dieser Effekt bei MBa5 Zellen auf, deren Klonogenizität komplett inhibiert ist. Damit unterstreichen diese Versuche, dass das Zellwachstum bei 39°C starken klonalen Schwankungen unterliegt.

### 2.2.3 Vergleich der Zellzyklusregulation von transkriptionell und temperatur-reguliertem TAg

TAg inhibiert, wie oben bereits erwähnt, p53 und pRB. Durch die Inaktivierung von TAg werden die Tumorsuppressoren reaktiviert und damit ein Zellzyklusblock ausgelöst. Dieser Effekt sollte in den verschiedenen Systemen untersucht werden.

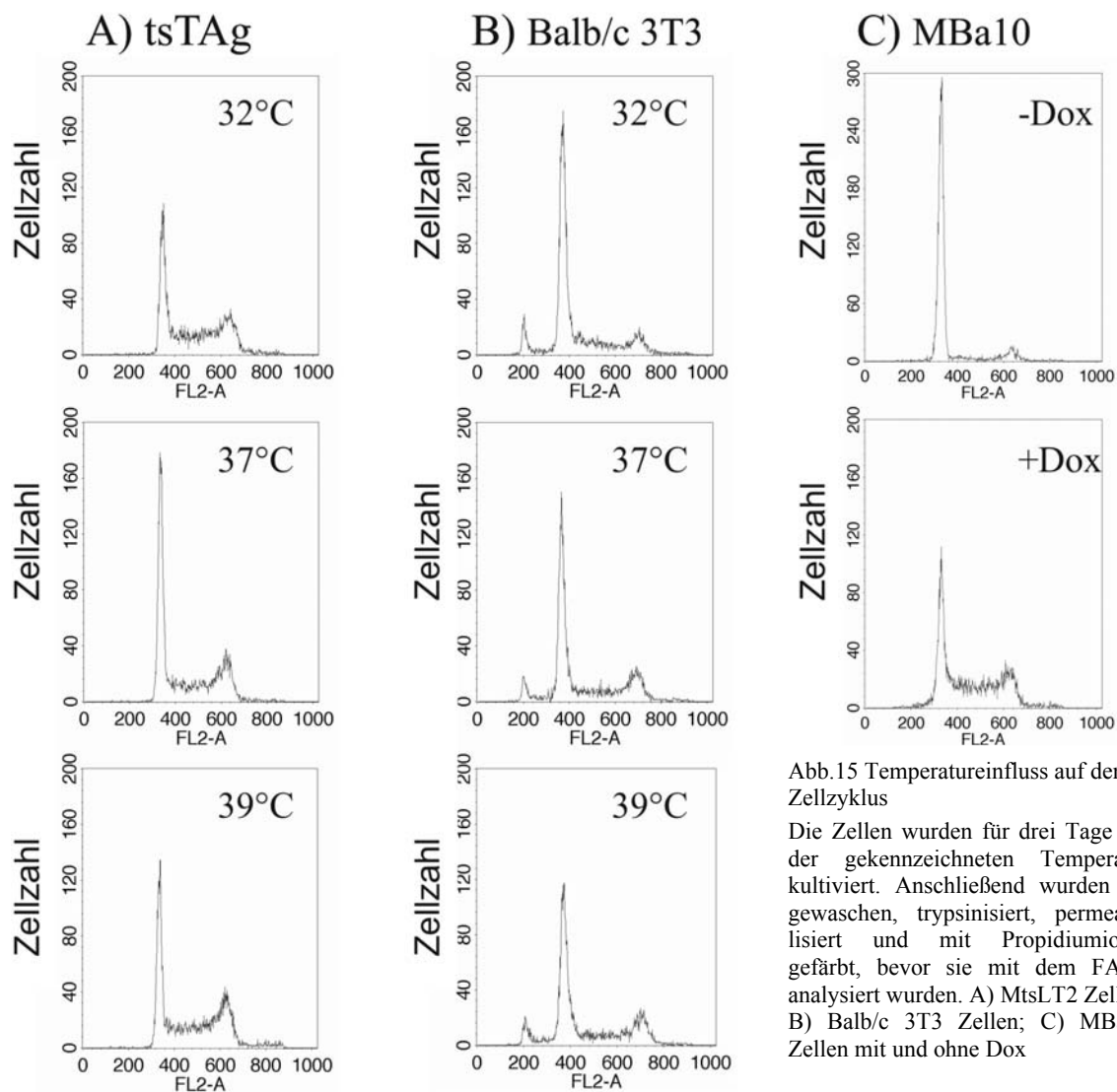


Abb.15 Temperatureinfluss auf den Zellzyklus

Die Zellen wurden für drei Tage bei der gekennzeichneten Temperatur kultiviert. Anschließend wurden sie gewaschen, trypsinisiert, permeabilisiert und mit Propidiumiodid gefärbt, bevor sie mit dem FACS analysiert wurden. A) MtsLT2 Zellen; B) Balb/c 3T3 Zellen; C) MBa10 Zellen mit und ohne Dox

Daher wurde das Zellzyklusprofil der tsTAg-Zellen bei 32°C, 37°C und 39°C analysiert. Die Inaktivierung des tsTAg bei höheren Temperaturen (siehe Abb. 12 A) sollte zu einem Anstieg der Zellen in der G1/G0 Phase des Zellzyklusses führen. Allerdings wurde kein signifikanter Effekt der Temperatur auf den Zellzyklus beobachtet (Abb. 15 A). Da diese Zellen bei 39°C aber kaum proliferieren, wird dieser Wachstumsblock nicht durch TAg, sondern vermutlich durch die suboptimalen Kultivierungsbedingungen ausgelöst. Diese Erklärung wird dadurch bestätigt, dass auch bei den anderen untersuchten Zelllinien Balb/c 3T3 (Abb. 15 B) und MBa5/10 (Daten nicht gezeigt) die Temperatur den Zellzyklus nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte bei den pRITA-immortalisierten Zellen die Inaktivierung von TAg (-Dox) zu einer Akkumulation der Zellen in der G1/G0 Phase des Zellzyklus (>80 % der Zellen). Wohingegen bei Aktivierung von TAg (+Dox) sich mehr als 60% der Zellen in der S- oder G2/M-Phase befinden (Abb. 15 C). Dieses Resultat verdeutlicht den drastischen Effekt von TAg auf den Zellzyklus.

Die Ergebnisse der Balb/c 3T3 und MBa5/10 Zellen zeigen, dass die suboptimalen Kultivierungsbedingungen bei 39°C bereits einen Proliferationsstopp auslösen können. Das Problem der suboptimalen Kultivierung wird mit dem Dox-regulierten Vektor pRITA gelöst. Darüber hinaus korrelieren bei den pRITA-immortalisierten Zellen Proteinlevel, Proliferationsverhalten und Zellzyklusprofil miteinander und zeigen so, dass die Proliferation allein auf TAg beruht. Da das transkriptionell regulierte TAg zusätzlich eine stringendere Kontrolle der Proliferation erlaubt als seine temperatursensitive Mutante, ist pRITA die bessere Alternative für die konditionale Immortalisierung.

### **2.3 Sind aktivierte pRITA-Zellen immortalisiert oder transformiert?**

Die bisherigen Experimente demonstrieren das exponentielle Wachstumsverhalten der aktivierten pRITA-Zellen. Allerdings kann nicht unterschieden werden, ob die Zellen transformiert oder immortalisiert sind, da beide Zustände in Kultur ein solch unbegrenztes, exponentielles Wachstum zeigen. Der Unterschied zwischen beiden liegt in der Fähigkeit Tumore zu bilden (Tumorigenizität). Transformierte Zellen bilden Tumore, immortalisierte hingegen nicht. Um Tumorigenizität auch *in vitro* nachzuweisen, gibt es Assays, wie Klonogenizität (siehe Kapitel 2.1 und 2.2.2), Focusbildung und Wachstum im halbfesten Medium („Weichagartest“).

Für einen Focusbildungsassay werden die Zellen nahezu konfluent (80-90 %) ausplattiert und für zwei bis drei Wochen kultiviert. Transformierte Zellen wachsen dann nicht nur neben- sondern auch übereinander und bilden sogenannte Foci. Der Weichagartest macht sich zu

Nutze, dass transformierte Zellen keinen Kontakt zu festen Oberflächen brauchen. Für den Weichagartest werden die Zellen in geringer Dichte in Agar, welcher mit Medium versetzt ist, ausgesät. Während transformierte Zellen in dem Agar Kolonien bilden, bleiben Zellen, die keine Tumorigenizität aufweisen, vereinzelt.

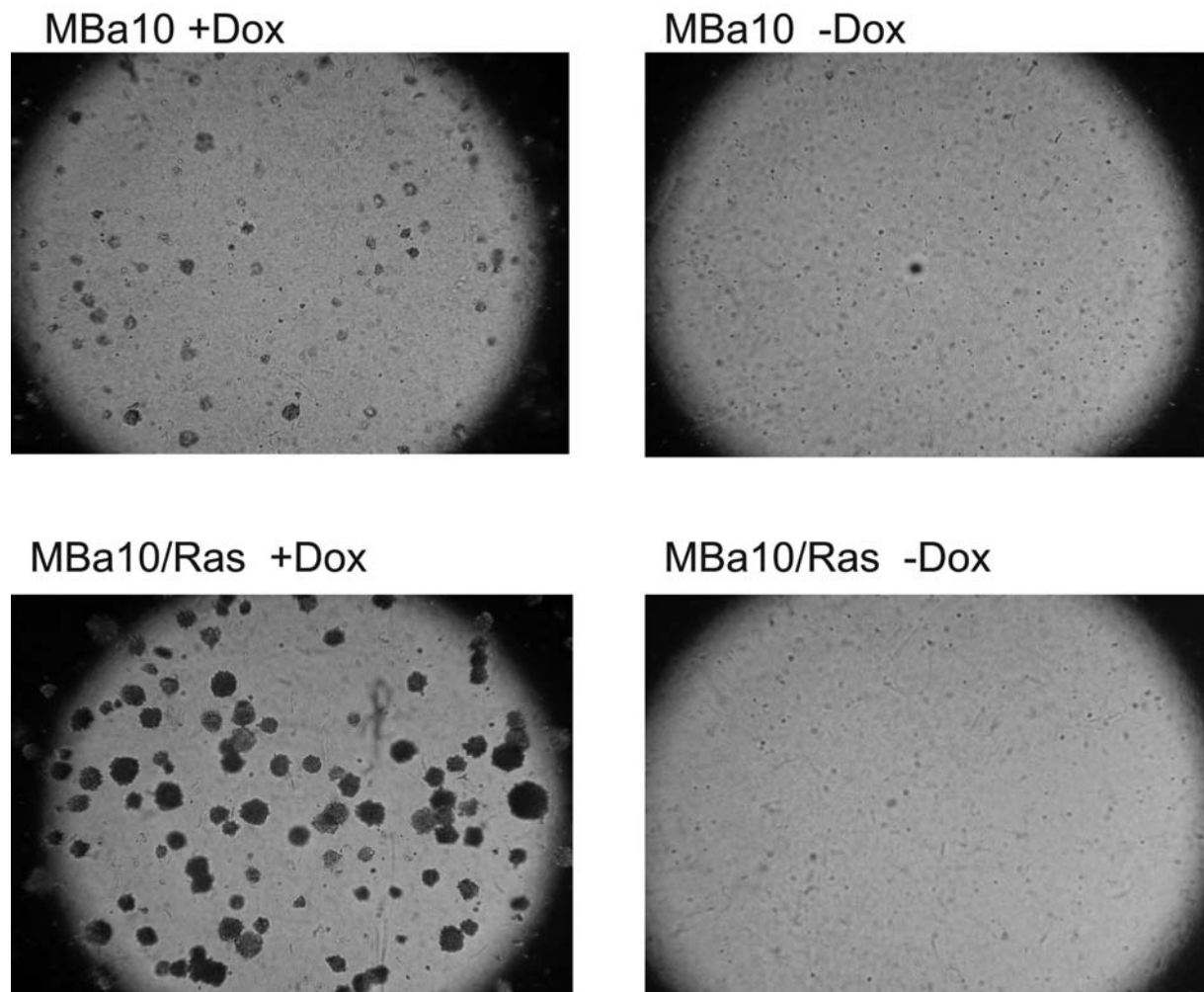


Abb. 16 „Weichagar Test“ in Abhängigkeit von Dox  
Die Zellen wurden für zwei Wochen in mit Medium versetzten Agar mit und ohne Dox kultiviert. Die Bilder sind alle mit der gleichen Vergrößerung aufgenommen worden (Nikon CoolPix).

Obere Spalte: MBa10 Zellen

Untere Spalte: MBa10 Zellen zusätzlich das v-Ha-ras Onkogen konstitutiv exprimierend

pRITA-Zellen wurden diesen verschiedenen Tests unterzogen, wobei bereits gezeigt wurde, dass sie im aktivierten Zustand eine hohe Klonogenizität aufweisen (siehe Abb. 8 B). Im Gegensatz dazu bildete keine der etablierten Zelllinien Foci (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden pRITA-immortalisierte Zellen mit und ohne Dox für zwei Wochen im Weichagar kultiviert. Im abgeschalteten Zustand bildeten die Zellen, wie erwartet, keine Klone, aber auch mit Dox waren nur sehr kleine Kolonien zu erkennen, welche auch nach weiteren zwei Wochen in Kultur nicht größer wurden (Abb. 16).

Als Positivkontrolle wurden Zellen generiert, die neben TAG auch das v-Ha-ras Onkogen konstitutiv exprimieren, welches mit dem TAG in der Transformation von Zellen kooperiert

(Cavender et al., 1995; Beachy et al., 2002). Diese Zellen weisen im aktivierten Zustand eine sehr starke Focus- und Koloniebildung im Weichagar auf (Abb. 16). Interessanterweise waren sowohl Focus- als auch Weichagarkoloniebildung im reprimierten Zustand komplett inhibiert (Abb. 16), was darauf hindeutet, dass die Expression beider Onkogene für die Transformation notwendig ist. Der enorme Unterschied in Anzahl und Größe der entstehenden Klone zwischen TAG und TAG/v-Ha-ras Zellen beweist, dass pRITA-Zellen nur immortalisiert nicht aber transformiert sind.

## **2.4 Charakterisierung der reprimierten pRITA-Zellen**

### **2.4.1 Analyse des Proliferationsarrest**

Das Zellzyklusprofil zeigte einen Arrest der reprimierten Zellen in der G1/G0 Phase (siehe Abb. 15 C). Die Unterscheidung der Phasen G1 und G0 ist mit dieser Methode nicht möglich, da hierbei nur der DNA-Gehalt detektiert wird. Allerdings wird durch die Inaktivierung von TAG ein lang andauernder Wachstumsstopp ausgelöst (siehe Abb. 8 A). Dies legt die Vermutung nahe, dass die reprimierten Zellen sich nicht in der G1 Phase des Zellzyklusses befinden.

Neben der G0 Phase ist auch die Seneszenz ein Zustand, in dem die Zellen einen permanenten Wachstumsblock aufweisen. Während die in G0 arretierten Zellen wieder durch exogene Stimuli zur Proliferation angeregt werden können, ist dies bei seneszenten Zellen nicht möglich. Seneszenz kann durch eine Reihe von Faktoren wie Verkürzung der Telomere, oxidativer Stress oder DNA-Schäden ausgelöst werden. Merkmale seneszenten Zellen sind unter anderem ihre charakteristische Morphologie, eine erhöhte Granularität (Sitte et al., 2001; Bregegere et al., 2003) sowie eine intrinsische  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität (SA- $\beta$ -Gal; Dimri et al., 1995).

Die Kultivierung der pRITA-Zellen ohne Dox führt zu morphologischen Veränderungen. Sie werden im Verlaufe des Proliferationsarrests größer und bilden lange Ausläufer aus. Darüber hinaus wurde nach einer siebentägigen Kultur im abgeschalteten Zustand festgestellt, dass die Granularität der Zellen signifikant zunimmt (Daten nicht gezeigt). Diese Indizien deuten daraufhin, dass die pRITA-Zellen nach Dox-Entfernung seneszent werden.

Deshalb wurde eine SA- $\beta$ -Gal Färbung mit an- und abgeschalteten Zellen vorgenommen. Die aktivierten Zellen wiesen zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Färbung auf. Die reprimierten Zellen zeigten hingegen nach siebentägiger Kultivierung ohne Dox erstmals eine schwache Färbung, die mit zunehmender Kultivierungsdauer an Intensität zunahm (Abb. 17 A). Die SA- $\beta$ -Gal Färbung wird häufig als ein Marker für Seneszenz verwendet. Allerdings ist ihre



Spezifität nicht unumstritten (Severino et al., 2000). Deshalb wurde mittels Bromodeoxyuridin (BrdU) Inkorporation der Prozentsatz der replizierenden Zellen bestimmt (Abb. 17 B). BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Dadurch kann der Prozentsatz der Zellen bestimmt werden, der in einem bestimmten Zeitraum die S-Phase durchläuft. Senescente Zellen weisen nach einer langen Inkubation (48 bis 72 Stunden) mit BrdU nur einen sehr geringen Anteil an BrdU positiven Zellen auf (bis 5 %).

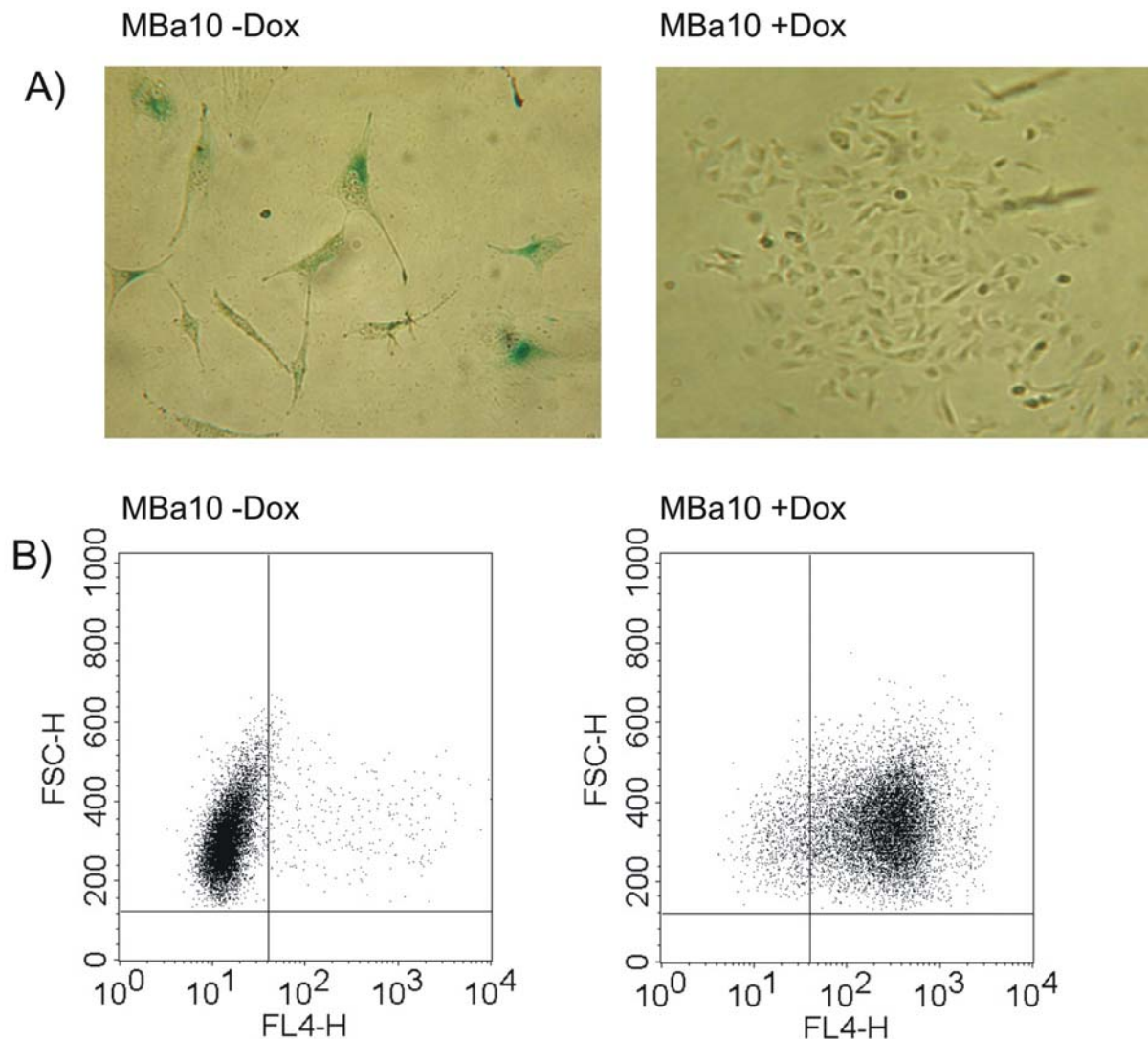


Abb.17 Evaluation von Seneszenzmarkern bei pRITA-immortalisierten Zellen

A) SA-β-Gal Färbung. MBa10 Zellen wurden mit und ohne Dox kultiviert (neun Tage), bevor die SA-β-Gal Färbung (für Details siehe Material und Methoden) durchgeführt wurde.

B) BrdU Färbung. MBa10 Zellen wurden für neun Tage ohne Dox kultiviert, bevor sie für weitere drei Tage mit BrdU-haltigem Medium (10μM) kultiviert wurden. Die aktivierten Zellen wurden für zwei Tage mit Dox kultiviert, bevor für 24 h BrdU (10μM) zum Medium gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und permeabilisiert, bevor das BrdU mit einem APC markierten Antikörper angefärbt wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem APC markierten Antikörper aber ohne BrdU behandelt wurden.

Nahezu 100 % der aktivierten pRITA-Zellen replizieren sich innerhalb von 24 Stunden einmal (Abb. 17 B). Die reprimierten Zellen (ohne Dox für neun Tage) wurden hingegen für 72 Stunden mit BrdU inkubiert. Trotz dieser längeren Inkubationsphase waren nur 3 % der

Zellen BrdU positiv (Abb. 17 B). Dieses Ergebnis unterstreicht die Qualität des Proliferationsblocks.

Die morphologischen Veränderungen, die erhöhte Granularität, die SA- $\beta$ -Gal Färbung und die BrdU Inkorporation zeigen, dass nach Dox-Entfernung und damit resultierender Inaktivierung von TAG die pRITA-immortalisierten Zellen einen seneszenten Phänotyp zeigen.

### 2.4.2 Reanimation seneszenten Zellen

Seneszente Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie trotz metabolischer Aktivität ihr Proliferationslimit erreicht haben und keine weiteren Zellteilungen mehr durchlaufen können. Zwei Studien konnten aufzeigen, dass durch genetische Manipulation dieser als irreversibel bezeichnete Zustand revertierbar ist (Dirac und Bernards, 2003; Beausejour et al., 2003).

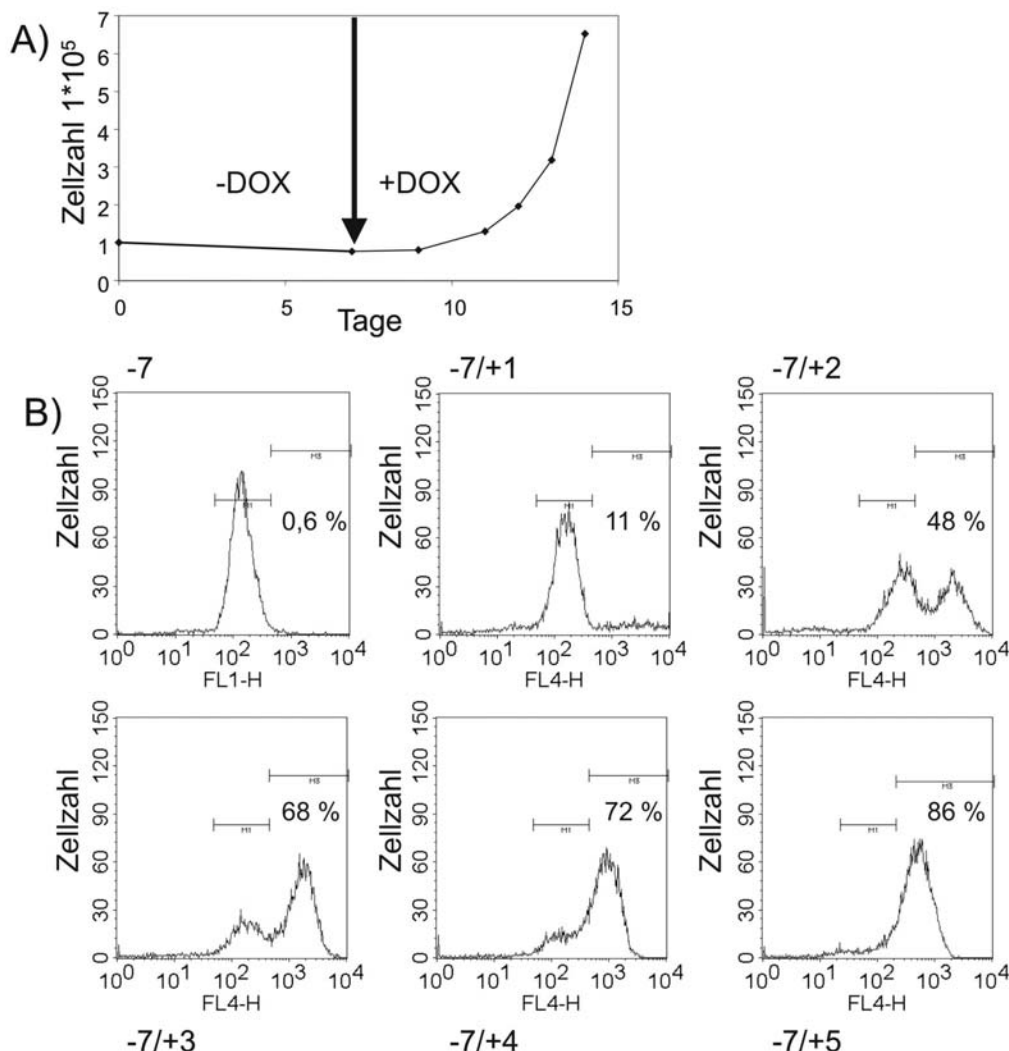


Abb.18 Reanimation seneszenten Zellen

$1 \cdot 10^5$  (A) oder  $3 \cdot 10^5$  (B) MBa10 Zellen wurden auf 55 cm<sup>2</sup> Platten ausgesät und für sieben Tage ohne Dox kultiviert. Anschließend wurde dem Medium Dox hinzugefügt und die Reanimation gemessen. A) Zellzahlbestimmung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Kulturen. B) BrdU Inkorporation. Die Zellen wurden für 24 h mit BrdU markiert, bevor sie geerntet wurden. Zur Analyse wurden die Zellen permeabilisiert und mit einem APC markierten anti-BrdU Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit Antikörper aber ohne BrdU behandelt wurden. Die Zahlen unter beziehungsweise über den Kästen geben die Zeit nach Reanimation an. Die Zahlen in den Kästen geben den Prozentsatz der BrdU-positiven Zellen an.

Deshalb sollte untersucht werden, ob auch das Anschalten der TAg-Expression eine Reanimation der seneszenten Zellen ermöglicht. Dafür wurden pRITA-immortalisierte Zellen für sieben Tage ohne Dox kultiviert. Dies führte, wie erwartet, zu einem Proliferationsstop und zur Induktion des seneszenten Phänotyps. Anschließend wurde Dox zum Medium gegeben und die Reanimation über die Zellzahl sowie über die BrdU Inkorporation verfolgt. Mittels Zellzahlbestimmung wurde gezeigt, dass nach einer kurzen Verzögerungsphase die Aktivierung von TAg auch zu einer Aktivierung der Proliferation führte (Abb. 18 A). Bei der BrdU Färbung traten nach Start der Reanimation zwei Zellpopulationen auf, eine BrdU negative (linker Balken) und eine BrdU positive (rechter Balken) (Abb. 18 B). Der Prozentsatz der BrdU-positiven Zellen steigerte sich im weiteren Verlaufe des Experiments, wobei nach fünf Tagen noch rund 15 % der Zellen keine DNA-Replikation aufwiesen. Dies legt den Schluss nahe, dass durch Dox-Zugabe nur ein Teil der Zellen zur DNA-Replikation und somit zur Proliferation angeregt werden.

Dieses Phänomen sollte näher mit Hilfe des Reportergens eGFP, welches sich auf pRITA befindet, untersucht werden. Hierfür wurden wieder Zellen für sieben Tage im reprimierten Zustand kultiviert, bevor Dox zum Medium gegeben wurde und mittels FACS die Zahl der eGFP-positiven Zellen ermittelt wurde. Auch bei diesem Experiment zeigte sich, dass nach Beginn der Reanimation eine eGFP-negative und eine eGFP-positive Zellpopulation entstand. Zudem wurde beobachtet, dass die eGFP-positive Population während der Reanimationsphase stetig zunahm. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da die eGFP-Expression durch Dox-Zugabe aktivierbar sein sollte, unabhängig davon, ob die Zellen proliferieren oder nicht. Allerdings scheinen Proliferation und eGFP-Expression während der Reanimation gekoppelt zu sein, da der Vergleich der eGFP- und BrdU-Daten eine Korrelation zwischen beiden aufzeigt (Tabelle 1).

	-Dox für 7 Tage	-Dox für 7 Tage	Modellrechnung		
	BrdU positive Zellen	GFP positive Zellen	reanimierbar	irreversibel	in %
+Dox (24h)	11 %	24,2 %	20	80	20 %
+Dox (48h)	48 %	47,2 %	40	80	33 %
+Dox (72h)	68 %	59,1 %	80	80	50 %
+Dox (96h)	72 %	75,3 %	160	80	66 %
+Dox (120h)	86 %	/	320	80	80 %

Tabelle 1 Korrelation zwischen BrdU-Inkorporation und eGFP-Expression

Diese Korrelation verdeutlicht außerdem, dass die Transgenexpression nur in einem Teil der Zellen wieder initiiert werden kann. Weiterhin zeigt dieses Ergebnis, dass wenn die

Transgenexpression in einer Zelle initiiert wird, diese Zelle auch wieder proliferiert. Darüber hinaus deuten die Resultate daraufhin, dass in rund 20 % der Zellen ein reversibles und in 80 % der Zellen ein irreversibles Seneszenzprogramm initiiert wurde. Um abschätzen zu können, ob die reanimierbaren Zellen synchron nach Dox-Zugabe mit der Proliferation beginnen, wurde eine Modellrechnung durchgeführt (Tabelle 1). Hierfür wurde angenommen, dass von 100 Zellen mit Dox-Zugabe 20 reanimiert werden, während die anderen einen irreversiblen Wachstumsstopp aufweisen. Weiter wurde angenommen, dass die reanimierbaren Zellen sich innerhalb von jeweils 24 Stunden verdoppeln. Diese einfache Modellrechnung lieferte bezüglich dem Anteil der proliferierenden Zellen vergleichbare Werte zu den experimentellen Daten (Tabelle 1). Somit scheint die Reanimation nach Dox Zugabe tatsächlich synchron in einem Teil der Zellen zu beginnen.

Daraufhin wurde untersucht, ob die Dauer der TAg-Inaktivierung einen Einfluss auf das Seneszenzprogramm hat. Hierfür wurden Zellen für vier, sieben und neun Tage ohne Dox kultiviert, bevor sie durch Dox-Zugabe reanimiert wurden. Aufgrund der aufgezeigten Korrelation zwischen eGFP und BrdU (Tabelle 1) wurde eGFP als Marker für reanimierte, proliferierende Zellen genutzt, wobei die eGFP-Expression mittels FACS ermittelt wurde. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von der Dauer der Reprimierung nur in einem Teil der Zellen wieder die Transgenexpression aktiviert werden kann. Allerdings wurde auch beobachtet, dass der Prozentsatz der reanimierbaren Zellen abnimmt, je länger die induzierte Seneszenz andauerte. So wurden nach einer viertägigen Inaktivierung von TAg durch Dox-Zugabe rund 30 % Zellen aktiviert, während es nach einer neuntägigen Inaktivierung lediglich noch 12 % waren (Tabelle 2). Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis darauf, dass sich Seneszenz mit zunehmender Dauer irreversible manifestiert.

	-Dox für 4 Tage	-Dox für 7 Tage	-Dox für 9 Tage
	GFP positive Zellen	GFP positive Zellen	GFP positive Zellen
+Dox (24 h)	29,6 %	24,2 %	12,2 %
+Dox (48 h)	55,9 %	47,2 %	37,3 %
+Dox (72 h)	72,1 %	59,1 %	63,9 %
+Dox (96 h)	91,9 %	75,3 %	74,1 %

Tabelle 2 Einfluss der Reprimierungsdauer auf die Reanimation

Die Funktion oder genaue Ursache der Seneszenz ist nicht geklärt. Wahrscheinlich ist sie eine Art Schutzmechanismus der Zelle vor schädlichen äußeren Einflüssen. Deshalb wurde überprüft, ob durch andere Kultivierungsbedingungen, welche zusätzlichen Stress auf die Zellen ausüben, die Induktion des irreversiblen Programms weiter forciert wird. Hierfür

wurden abgeschaltete Zellen in niedriger Zelldichte ausgesät. Anschließend wurde Dox dem Medium zugefügt und die Koloniebildung analysiert.

Zellen die während der gesamten Versuchsdauer ohne Dox kultiviert wurden, bildeten im Gegensatz zu aktivierten Zellen (+Dox) keine Kolonien (Abb. 19 Vgl. Platte –34 mit +12). Eine neuntägige Phase im reprimierten Zustand hatte keinen Einfluss auf die Klonogenizität (Abb.19 Vgl. Platten +12 mit –9/+12). Hingegen war die Koloniebildung bei längerer Kultivierung ohne Dox stark beeinträchtigt (Abb.19 Vgl. Platten –12/+12 und –20/+14). Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch Dox-Entzug induzierte Seneszenz in einem Teil der Zellen revertierbar ist, während der andere Teil der Zellen einen irreversiblen Proliferationsstopp vollzieht. Der Anteil der reanimierbaren Zellen wird von der Dauer der induzierten Seneszenz und den Kultivierungsbedingungen beeinflusst.

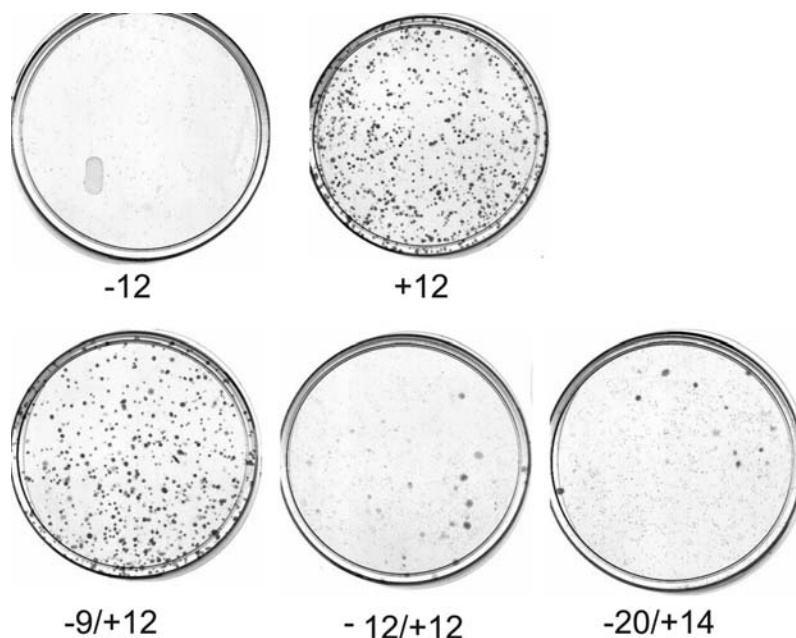


Abb.19 Klonogenizität von reanimierten Zellen

$1 \cdot 10^3$  MBa10 Zellen wurde auf eine  $55 \text{ cm}^2$  große Platte ausgesät und wie angegeben kultiviert. Unter den Platten sind die Kultivierungsbedingungen („-“, „+“ oder „+“ Dox) sowie die Dauer der Kultivierung angegeben.

## 2.5 Einfluss von TAg auf die Genexpression

### 2.5.1 Vergleich des Transkriptoms aktivierter und reprimierter Zellen

Die bisher vorgestellten Experimente charakterisierten die pRITA-immortalisierten Zellen fast ausschließlich auf zellulärer Ebene. Dabei konnte gezeigt werden, dass pRITA eine äußerst strikte Proliferationskontrolle vermittelt. Es sollte untersucht werden, wie sich die TAg-Expression auf molekularer Ebene auswirkt und inwieweit auch hier die induzierten Veränderungen revertierbar sind.

Um einen möglichst umfassenden Einblick in die ablaufenden Prozesse zu erhalten, wurde die sogenannte „DNA-Chip“ Methode verwendet. Diese bietet die Möglichkeit das Expressionsmuster von mehreren tausend Genen gleichzeitig zu analysieren. Für die nachfolgenden Analysen wurden Chips (Affymetrix) benutzt, auf denen sich mehr als  $2 \cdot 10^5$  25 bp-lange Oligonukleotide befinden. Dabei wird jedes Gen durch einen „Spot“ repräsentiert, in dem sich elf genspezifische („perfect match“) und elf mutierte („mismatch“) Oligonukleotide befinden. Durch Hybridisierung der zellulären Fluoreszenz-markierten RNA gegen die Oligonukleotide der Chips erhält man quantitative Signale, die die relative Expressionshöhen der RNAs widerspiegeln. Über den Vergleich des Fluoreszenzsignals von „perfect match“ mit „mismatch“ Oligonukleotiden kann neben dem relativen Genexpressionslevel auch die Spezifität der Hybridisierungsreaktion beurteilt werden.

Die Schwierigkeit bei der Auswertung der „DNA-Chip“-Experimente ist, valide Ergebnisse aus der großen Datenmenge herauszufiltern, da neben dem Vektor auch maßgeblich der klonale Ursprung, das Geschlecht oder der Inzuchtstamm das Expressionsmuster einer Probe beeinflusst. Daher sollten bei jedem Experiment entweder technische oder biologische Duplikate verwendet werden.

Die molekulare Analyse der TAg-induzierten Änderungen wurde mit den zwei Zelllinien MBa5 (männlich) und MBa10 (weiblich), die aus unterschiedlichen Chargen MEF mit Hilfe von pRITA generiert wurden, durchgeführt. Die hohe biologische Varianz sollte sicherstellen, dass durch Vergleich aller Proben vektorinduzierte Gene sichtbar werden. Außerdem wurden die Proben mit hoher Sorgfalt generiert. So wurde unter anderem die Kultivierung stets mit dem gleichem Medium durchgeführt, alle Proben wurden in der gleichen Zellzahl ausgesät und die RNA einer Probe wurde aus fünf unabhängigen Kulturen gewonnen. Darüber hinaus wurde immer das gleiche RNA-Isolierungsprotokoll und „DNA-Chips“ der gleichen Charge verwendet.

Zunächst wurden Proben von induzierten und reprimierten Zellen generiert. Dafür wurden exponentiell wachsende Zellen beider Klone (+Dox) gesplittet und für weitere zwei Tage mit Dox (Proben: MBa5+ und MBa10+) beziehungsweise für drei Tage ohne Dox (Proben: MBa5- und MBa10-) kultiviert. Die gewählten Zeiten gewährleisteten zum einen exponentielles Zellwachstum und zum anderen eine komplette Inaktivierung des Vektors.

Um den Effekt eines zwischenzeitlichen Proliferationsstopps auf das Transkriptom zu untersuchen, wurde zunächst durch eine neuntägige Kultivierung ohne Dox Seneszenz induziert. Nachfolgend wurden die Zellen durch Dox-Zugabe für 14 Tage reanimiert, bevor

sie wieder für zwei Tage mit (Proben: MBa5R+ und MBa10R+) beziehungsweise für drei Tage ohne Dox (Proben: MBa5R- und MBa10R-) kultiviert wurden (Abb. 20).

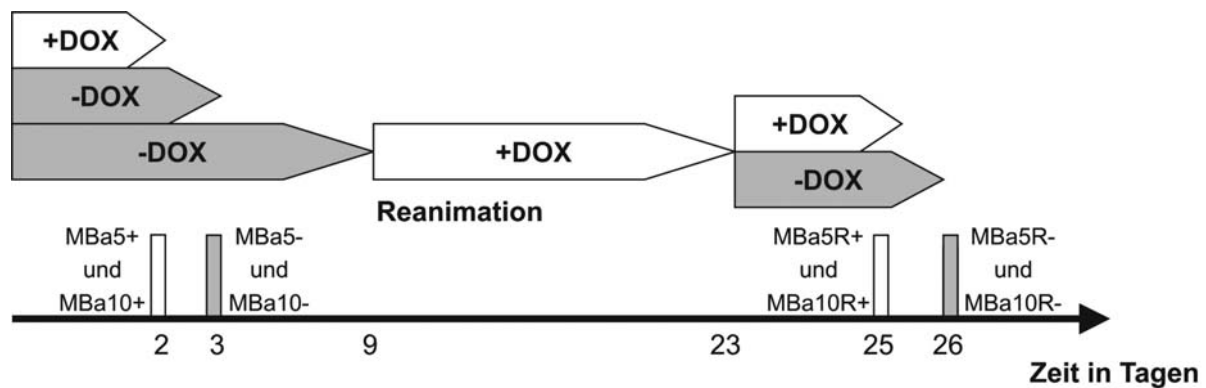


Abb. 20 Versuchsaufbau der Genexpressionsanalyse

Der Versuch wurde mit zwei verschiedenen pRITA-immortalisierten Zelllinien durchgeführt (MBa5 und MBa10). Schematisch dargestellt ist die Dauer der Aktivierungs- beziehungsweise Inaktivierungsphasen. Die Proben, welche die Reanimation durchlaufen haben, sind zunächst für neun Tage ohne Dox kultiviert worden. Anschließend wurde Dox dem Medium zugefügt und die Zellen für 14 Tage im aktivierten Zustand weitergehalten. Die Induktion der Seneszenz wurde mit der SA- $\beta$ -Gal Färbung in einer Parallelkultur nachgewiesen. Die strikte Proliferationskontrolle der Zellen wurde am Anfang und Ende des Versuchs über einen Klonogenizitätsassay nachgewiesen.

Nach der Hybridisierung der Fluoreszenz-markierten RNA mit den „DNA-Chips“ wurden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen „Spots“ quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass von den 22600 Genen des Chips in den Proben rund 12700 Gene (56 %) als exprimiert detektiert wurden. Anschließend wurde das Transkriptom der induzierten mit dem der reprimierten Zellen verglichen (Tabelle 3; zum Beispiel MBa10+ mit MBa10-). Dabei wurden Gene als hoch- beziehungsweise herunterreguliert definiert, die mindestens eine zweifach höhere (niedrigere) Expression im angeschalteten gegenüber dem abgeschalteten Zustand aufwiesen. Diese üblicherweise verwendete Methode hat den Nachteil, dass Gene auch als differentiell reguliert erscheinen, wenn sie hohen Schwankungen unterliegen, wie es insbesondere bei niedrig exprimierten Genen häufig vorkommt (Cui und Churchill, 2003). Zusätzlich sollten deshalb differentiell exprimierte Gene in einem der beiden Zustände einen Intensitätsschwellenwert überschreiten (Yang et al., 2002).

	Anzahl der regulierten Gene
MBa10+ mit MBa10-	1214
MBa10R+ mit MBa10R-	1203
MBa5+ mit MBa5-	1012
MBa5R+ mit MBa5R-	758
<b>in allen Vergleichen gefunden</b>	<b>487</b>
Balb/c 3T3+ mit Balb/c 3T3-	1

Tabelle 3 Anzahl der differentiell exprimierten Gene

Der Vergleich der an- und abgeschalteten MBa Zellen zeigt, dass zwischen 750 und 1200 Genen die obengenannten Kriterien erfüllen (Tabelle 3). Dies entspricht zwischen 6 % und 9,5 % der insgesamt detektierten Gene und verdeutlicht den deutlichen Einfluss von TAg auf das Transkriptom. 487 Gene erwiesen sich in allen Vergleichen als differentiell reguliert. Diese Gene wurden für die weitere Analyse verwendet, da sie wahrscheinlich durch den Vektor induziert werden. Um unspezifische Effekte des Dox auf das Genexpressionsmuster ausschließen zu können, wurden in einem Kontrollexperiment spontan immortalisierte Balb/c 3T3 Zellen, die aus derselben Charge MEF wie MBa10 Zellen stammen, mit und ohne Dox behandelt und die differentiell regulierten Gene ermittelt (Tabelle 3; unterste Spalte). Hierbei zeigte sich, dass Dox in der verwendeten Konzentration keinen Einfluss auf das Genexpressionsmuster dieser Zelllinie hat.

### **2.5.2 Charakterisierung der differentiell regulierten Gene**

Das „Gene Ontology Consortium“ (Ashburner et al., 2000) annotiert Gene beziehungsweise ihre Produkte nach deren molekularen Funktion, dem zellulären Kompartiment, in dem sie sich befinden und dem biologischen Prozess, an dem sie beteiligt sind. Jedes Gen erhält mehrere Annotationen, die mit allgemeinen Begriffen beginnen und zunehmend spezifischer werden. Ein Beispiel für solch eine Genannotation ist: „Zelle- intrazellulär- Kern- Kernplasma- Replikationsgabel“. Diese Annotationen können auch vereinfacht als Baum dargestellt werden. Das Programm „GOSurfer“ (Zong et al., 2004) nutzt diese Annotationen und vergleicht Genlisten auf signifikante Überrepräsentation bestimmter Kategorien. Von den 487 differentiell regulierten Genen waren 271 hoch- und 216 runterreguliert. Diese wurden mittels „GOSurfer“ analysiert. Dabei wurde überprüft, ob Gene bestimmter Funktion oder Lokalisierung in einem der beiden Zustände vermehrt exprimiert werden. Der Vergleich dieser beiden Listen bezüglich zellulärer Kompartimente zeigte, dass im angeschalteten Zustand (rote Linien) die Kategorie „Nukleus“ und im abgeschalteten (grüne Linien) die Kategorien „Membran“ und „Vakuole“ überrepräsentiert waren (Abb. 21 A). Die Analyse der Annotationen für biologische Prozesse deckte auf, dass im aktivierten Zustand die Kategorien „Zellwachstum“, „Zellzyklus“ sowie „RNA-“ und „DNA-Metabolismus“ verstärkt auftraten (Abb. 21 B). Schon diese grobe Auswertung der Expressionsdaten reflektiert das beobachtete Proliferationsverhalten der pRITA-immortalisierten Zellen.



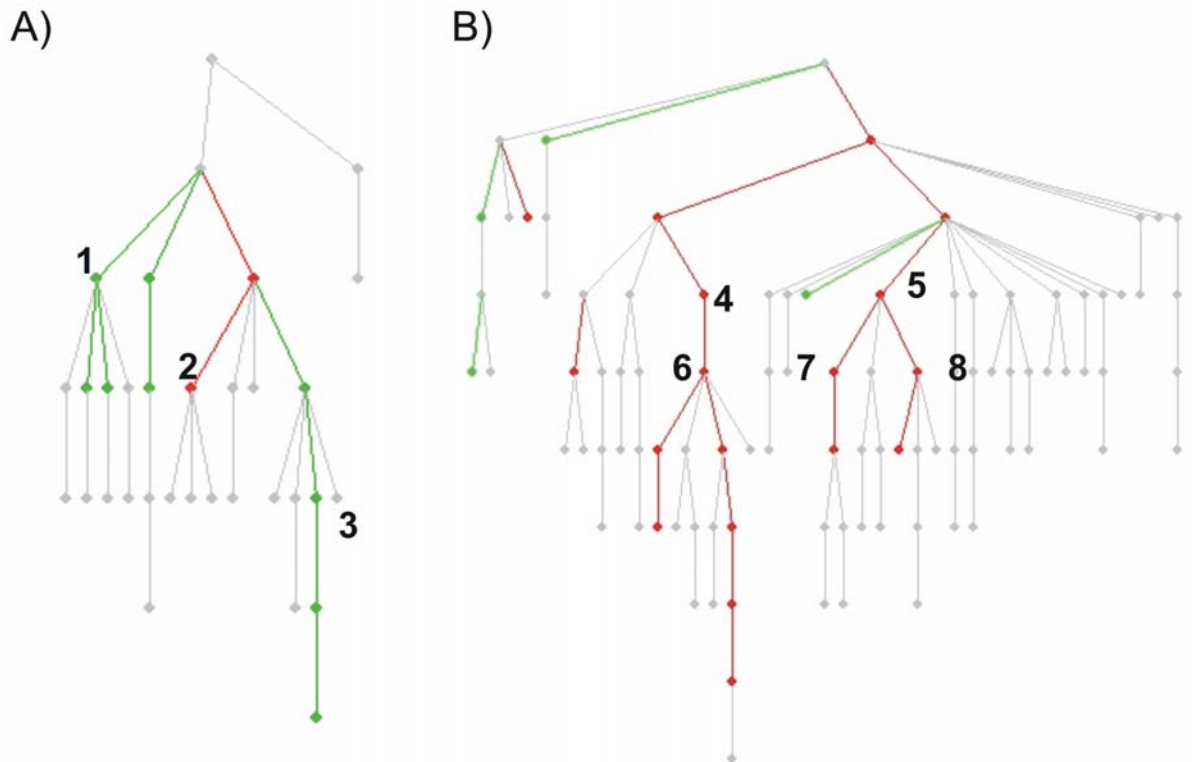


Abb. 21 Einfluss von TAG auf die Genexpression

Analyse der differentiell exprimierten Gene mittels der „Gene Ontology“ Hierarchie für A) zelluläre Kompartimente; und B) biologische Prozesse. Die dargestellten Bäume bestehen aus den Kategorien, die wenigstens 3 Gene (A) oder 5 Gene (B) beinhalten. Rote Kategorien sind überrepräsentiert in den aktivierten Zellen, grüne in den reprimierten Zellen ( $p < 0,05$ ). Graue Kategorien sind nicht signifikant verändert. Die Zahlen sind ausgewählte Kategorien dieser Analyse. (1) Membran; (2) Nukleus; (3) Vakuole; (4) Zellwachstum; (5) Nukleotid Metabolismus; (6) Zellzyklus; (7) RNA Metabolismus; (8) DNA Metabolismus.

Wie bereits beschrieben, moduliert TAG die Aktivität einer Reihe von Proteinen, unter anderem auch die Tumorsuppressoren p53 und pRB. pRB bindet und inaktiviert den Transkriptionsfaktor E2F-1. Dieser initiiert die Expression einer Reihe von Genen, die für die Proliferation essentiell sind (Übersicht in Harbour und Dean 2000). TAG verhindert die Inaktivierung des E2F-1 durch pRB und sorgt somit für eine Aktivierung dieser Gene.

E2F-1 befindet sich nicht unter den differentiell regulierten Genen (siehe Diskussion Kap. 3.4.3), aber einige seiner bekannten Zielgene sind in den Vergleichen von aktivierten und reprimierten pRITA-Zellen induziert, was indirekt auf eine Inaktivierung von pRB hindeutet. Die Produkte der E2F-1 induzierten Gene haben verschiedene Funktionen, wie beispielsweise Initiierung der S-Phase, DNA Synthese oder auch die Formation des Replikationskomplexes (Tabelle 4).

p53 wird durch TAG gebunden und stabilisiert. Diese Interaktion führt aber auch zu einer Blockierung der Transaktivierungsdomäne von p53. Demnach wird p53 durch Dox-Entzug reaktiviert. Dieser Prozess wird durch die starke Regulation von p21 und Mdm2 verdeutlicht. In Tabelle 4 sind weitere Zielgene von p53 aufgeführt, die in der „DNA-Chip“ Analyse differentiell reguliert waren.

Neben p53 und pRB interagieren noch andere Proteine mit TAg, von denen Nucleolin, Bub1 und DNMT1 in der Genexpressionsanalyse detektiert wurden. Nucleolin ist wahrscheinlich zusammen mit TAg und der Topoisomerase I an der DNA Entwindung beteiligt (Seinsoth et al., 2003). Von der Methyltransferase DNMT1 konnte gezeigt werden, dass sie ein Effektor von TAg ist, deren Hochregulierung zu einer erhöhten Methylierung führt (Slack et al., 1999). Die Interaktion zwischen TAg und Bub1, einem Protein dass die Spindelbildung überwacht, kann möglicherweise für eine erhöhte genomische Instabilität verantwortlich sein (Cotsiki et al., 2003). Eine komplette Auflistung der differentiell exprimierten Gene sowie der Induktionsfaktoren befindet sich im Anhang.

<b>Gen</b>	<b>induziert von</b>	<b>Biologischer Prozeß</b>
Cyclin A2	E2F1	Eintritt in die S-Phase
Thymidin Kinase	E2F1	DNA-Synthese
Ribonucleotid Reduktase	E2F1	DNA-Synthese
MCM Gene	E2F1	“Replication licensing”
Rad51	E2F1	DNA-Reparatur
p21	p53	Zellzyklusregulation
Mdm2	p53	Ubiquitinylierung
Perp	p53	Apoptose
Apaf1	p53	Apoptose
Btg2	p53	DNA-Reparatur
Cyclin G1	p53	p53-Stabilisierung
Nucleolin	TAg	DNA-Entwindung
Dnmt1	TAg	DNA-Methylierung
Bub1	TAg	Kontrollpunkt der Spindelbildung

Tabelle 4 Auswahl der differentiell exprimierten Gene

Wie erwartet wurden nicht alle in der Literatur beschriebenen Zielgene von p53, E2F-1 oder TAg zwischen reprimierten und aktivierten pRITA-Zellen differentiell reguliert. Dies kann zum Beispiel damit erklärt werden, dass einige Zielgene nicht auf dem „DNA-Chip“ vorhanden sind. Darüber hinaus werden viele Zielgene nur in bestimmten Zelltypen induziert, so dass eine Induktion in pRITA-Zellen gar nicht erwartet werden konnte. Eine ausführlichere Erörterung dieses Punktes findet in der Diskussion statt (Kapitel 3.4.3).

Insgesamt konnte neben der Analyse mittels der „Gene Ontology“ Annotationen zusätzlich eine Validierung der Expressionsdaten auf Genebene erreicht werden. Zusammenfassend kann eine gute Korrelation zwischen Expressionsdaten und den Proliferationseigenschaften

der pRITA-immortalisierten Zellen festgestellt werden. Weiterhin ist durch die differentielle Expression von 487 Genen der starke Einfluss von TAg auf das Transkriptom aufgezeigt.

### 2.5.3 Einfluss der Reanimation auf das Genexpressionsmuster

Durch das Aktivieren und Inaktivieren von pRITA werden zwei gegensätzliche zelluläre Zustände, Proliferation und Seneszenz, induziert. Diese wurden in den beiden vorherigen Kapiteln auf molekularer Ebene analysiert, wobei die unterschiedlichen Expressionsmuster der an- beziehungsweise abgeschalteten Zellen aufgezeigt wurden.

Wie in Kapitel 2.4.2 bereits beschrieben wurde, erlaubt pRITA neben der Induktion der Seneszenz auch die Reanimation aus diesem Zustand. Allerdings kann nur ein Teil der seneszenten Zellen wieder zur Proliferation angeregt werden, wobei die Effizienz der Reanimation von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird (siehe Kapitel 2.4.2).

Ziel der folgenden Analysen war die Ähnlichkeit der verschiedenen Proben vor und nach Reanimation zu ermitteln. Aus diesem Grund wurden die Proben gleicher Zustände vor und nach Reanimation untersucht. Damit sollte beantwortet werden, ob die induzierte Seneszenz nachhaltig das Expressionsmuster verändert oder ob TAg vergleichbare Änderungen im Transkriptom hervorruft.

Hierfür wurde das sogenannte „Clustering“ verwendet. Mittels dieses Verfahren werden alle Proben bezüglich ihrer Genexpression verglichen. Dabei werden die Proben, die das ähnlichste Genexpressionsmuster aufzeigen, gruppiert.

Es gibt verschiedene Clustermethoden, die in die Gruppen überwachtes und unüberwachtes „Clustern“ („supervised“ und „unsupervised“) unterteilt werden können. Für das überwachte „Clustern“ werden allerdings Angaben benötigt, die Vorwissen über das erwartete Genexpressionsmuster voraussetzen. Da dies nicht vorlag, wurde ein unüberwachtes „Clustering“ durchgeführt. Zunächst wurde ein hierarchisches „Clustering“ benutzt, welches auch in der sequenz- und der phylogenetischen Analyse Verwendung findet. Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Elementen (Proben oder Gene) werden durch einen Baum dargestellt. Die Länge der Zweige reflektiert den Grad der Verwandtschaft, wobei das Verwandtschaftsverhältnis umso größer ist, je kürzer die verbindenden Linien sind. Die „Clusteranalyse“ der 487 differentiell regulierten Gene ergab einen aus zwei Hauptzweigen aufgebauten Baum, wobei die aktivierten Zellen den einen und die reprimierten Zellen den anderen Ast bildeten (Abb. 22). Weiterhin zeigte sich, dass die Proben eines Klons vor und nach der Reanimation den größten Verwandtschaftsgrad aufwiesen. Darüber hinaus deutet die kurze Distanz zwischen diesen Proben auf ihre große Ähnlichkeit hin.

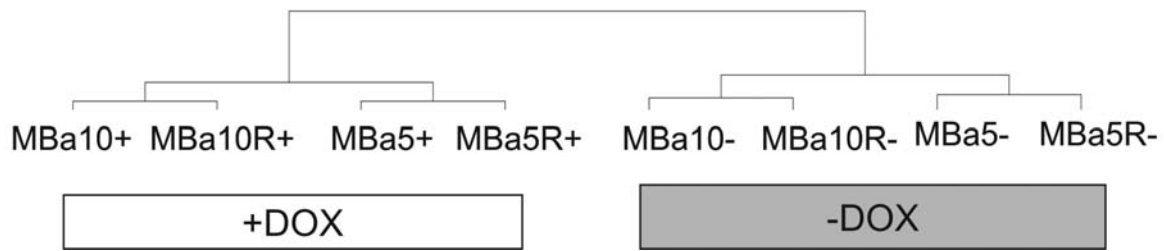


Abb. 22 Hierarchische „Clusteranalyse“ der einzelnen Proben

Die Rohdaten (Fluoreszenzintensität) der differentiell exprimierten Gene wurden in das Programm „Genesis“ (Sturn et al., 2002) importiert. Anschließend wurden sie normalisiert und mittels hierarchischem „Clustering“ gruppiert (Eisen et al., 1998). Das „Clustering“ verwendete den „Average linkage“ Algorithmus und als Distanzmaß diente die euklidische Distanz. Gezeigt ist das resultierende Dendrogramm. Die einzelnen Proben sind an den Spitzen der Äste angegeben (Mit „R“ sind die reanimierten Proben bezeichnet.). Die Bezeichnung der Proben bezieht sich auf die Abbildung 20 im Kapitel 2.5.1.

Daraufhin wurden die Proben vor und nach der Reanimation direkt miteinander verglichen und die Anzahl der differentiell exprimierten Gene bestimmt. Dabei sind die in Kapitel 2.5.1 beschriebenen Bedingungen verwendet worden (mindestens zweifache Regulation; Fluoreszenzintensität muss Schwellenwert überschreiten). Die direkten Vergleiche zeigten, dass nur wenige Gene differentiell exprimiert waren und somit die Genexpression innerhalb dieser Proben nur zu einem sehr geringem Ausmaß variiert (Tabelle 5). Zusätzlich wird durch dieses Resultat die große Ähnlichkeit der Proben vor und nach Reanimation bestätigt, was nahe legt, dass das Transkriptom dieser Zustände nicht nur ähnlich, sondern praktisch identisch ist.

	Anzahl der Gene
MBa10+ mit MBa10R+	0
MBa10- mit MBa10R-	1
MBa5+ mit MBa5R+	1
MBa5- mit MBa5R-	22
<b>in allen Vergleichen gefunden</b>	<b>0</b>

Tabelle 5 Vergleich der Proben vor und nach Reanimation

Dies sollte weiter untersucht werden. Daher wurde eine zweite „Clusteranalyse“ durchgeführt bei der nicht die Proben, sondern die Gene gruppiert werden. Bei diesem Vorgang wird die Expression der Gene in den verschiedenen Proben analysiert. Nachfolgend werden die Gene, die ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen, einem „Cluster“ zugeordnet.

Die 487 differentiell regulierten Gene (Tabelle 3) wurden mittels eines sogenannten „k-means Clustering“ gruppiert (Tavazoie et al., 1999). Die entstehenden „Cluster“ konnten grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Drei „Cluster“ beinhalteten Gene, die höher exprimiert sind, wenn TAg induziert ist (Abb. 23 CL1-CL3), während die anderen drei „Cluster“ Gene enthalten, die bei TAg-Expression niedriger exprimiert sind (Abb. 23 CL4-CL6). Dabei zeigte sich, dass jeweils die aktivierten und die inaktivierten Proben unabhängig von der Zelllinie

die gleiche Tendenz im Genexpressionsmuster aufweisen. Die Unterschiede in der relativen Expressionshöhe zwischen MBa5 und MBa10 Zellen eines Zustandes deuten klonale Schwankungen an. In CL2 und CL3 sind diese klonalen Differenzen in den aktivierten in CL5 und CL6 in den reprimierten Zellen sichtbar (Abb. 23). Möglicherweise resultieren diese aus einer unterschiedlich starken TAG-Expression in den verschiedenen Zelllinien. Im Gegensatz dazu weisen die Proben eines Klons vor und nach Reanimation praktisch auch die gleiche relative Expressionshöhe auf.

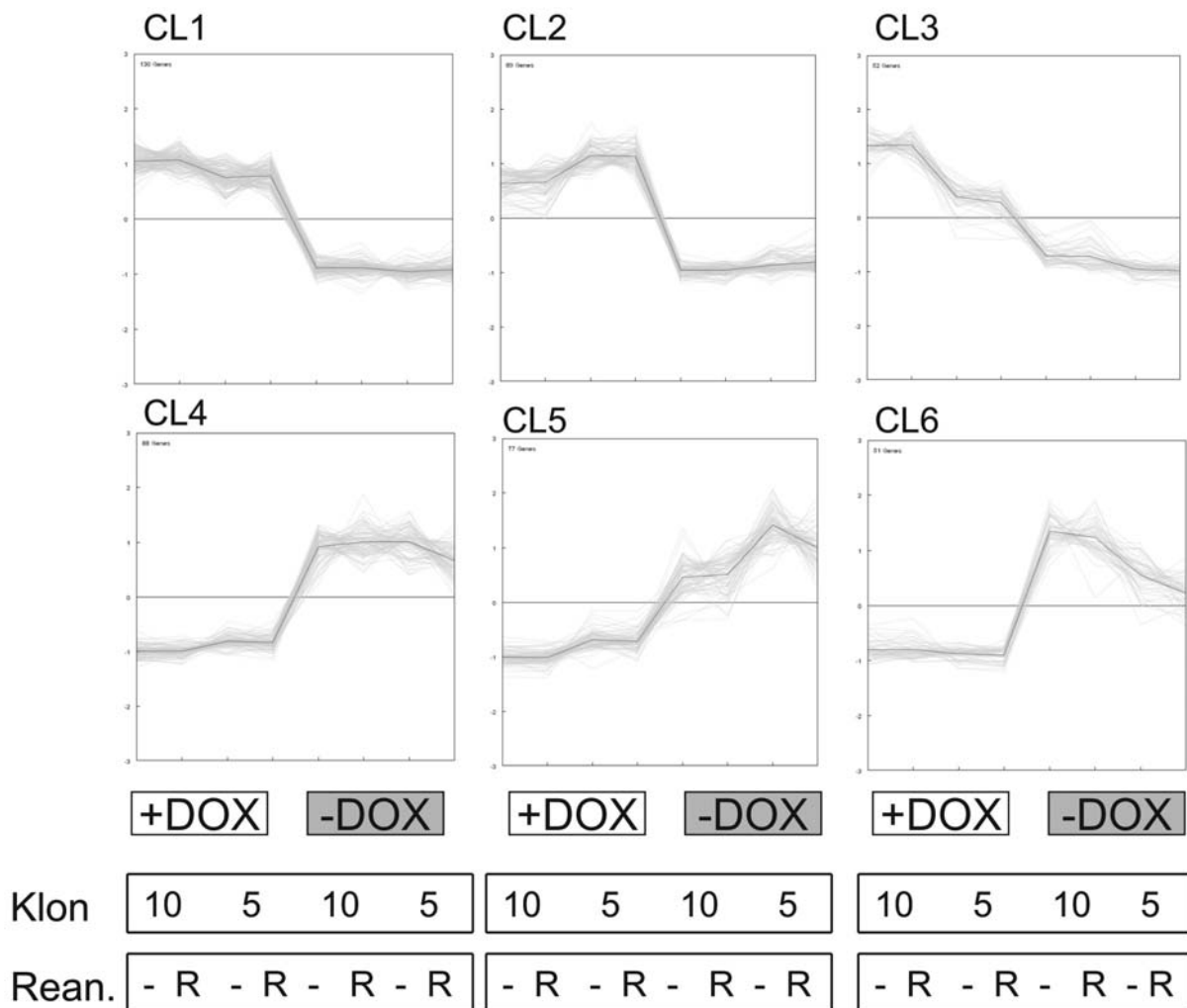


Abb.23 „Clusteranalyse“ der differentiell exprimierten Gene

Die Fluoreszenzintensitäten der 487 differentiell exprimierten Gene wurden in das Programm „Genesis“ importiert. Nach der Normalisierung wurde ein sogenanntes „k-Means Clustering“ mit der euklidische Distanz als Distanzmaß durchgeführt. Alle entstehenden „Cluster“ sind dargestellt, wobei die Proben auf der x-Achse aufgetragen sind (von links nach rechts: MBa10+; MBa10R+; MBa5+; MBa5R+; MBa10-; MBa10R-; MBa5-; MBa5R-). Auf der y-Achse ist die relative Genexpressionshöhe aufgetragen. Jedes Gen ist in dieser Darstellungsart durch eine graue Linie repräsentiert. Die dunkle Linie ist das Mittel aller Gene eines „Clusters“.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung von pRITA übereinstimmende Veränderungen des Transkriptoms bewirken. Dabei werden diese Änderungen vor und nach Reanimation ähnlich stark induziert.

Außerdem beweisen diese Übereinstimmungen, dass die Seneszenz keine irreversiblen Einfluss auf das Genexpressionsmuster hat.

## 2.6 Auswirkung der Immortalisierung mittels TAg

### 2.6.1 Spontane Mutationen in pRITA-immortalisierten Zellen

Die bisherigen Ergebnisse demonstrierten nicht nur die strikte durch pRITA-vermittelte Proliferationskontrolle, sondern zeigten auch, dass sehr spezifisch bestimmte Veränderungen im Transkriptom induziert werden. Da die pRITA-immortalisierten Zellen nur in Gegenwart von Dox wachsen, sind sie einer permanenten TAg Expression ausgesetzt. In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive TAg Expression nach längerer Inkubationszeit *in vivo* zur Tumorentstehung führt (zusammengefasst in Saenz-Robles et al., 2001). Darüber hinaus lieferte ein über das Tet-System induzierbares TAg den Nachweis, dass die entstehenden Tumore anfänglich (nach vier Monaten) auf die TAg Expression angewiesen waren. Längere Inkubationszeiten (>7 Monate) induzierten offenbar zusätzliche Mutationen, da zu den Zeitpunkten Tumorstadium auch in Abwesenheit von TAg auftrat (Ewald et al., 1996).

Daher wurde untersucht, ob *in vitro* die permanente TAg Expression die pRITA-immortalisierten Zellen nachhaltig verändert. Einen ersten Hinweis für solche zusätzlichen Veränderungen in den Zellen lieferte die Beobachtung, dass reprimierte Zellen vereinzelt Kolonien bildeten. Dies geschah, wenn sie längere Zeit abgeschaltet (>12 Tage) waren und in höheren Zelldichten ausgesät wurden. Zwölf von diesen Klonen wurden isoliert und auf ihr Regulationsverhalten hin untersucht (MBa10S-Klone).

Dazu wurde die Klonogenizität mit und ohne Dox analysiert. Das Experiment ergab, dass in beiden Zuständen sich ähnlich viele Kolonien bildeten. Damit weisen die MBa10S Zellen im Gegensatz zu den Ursprungszellen (MBa10) ein Dox-unabhängiges Wachstum auf (Abb. 24). Dieses Wachstumsverhalten der MBa10S Zellen wurde wahrscheinlich durch zusätzlich aufgetretene Mutationen ausgelöst. Es sollte daher überprüft werden, ob hierdurch die Tumorigenizität erhöht wird. Der Weichagartest (siehe Kapitel 2.3) bestätigte, dass die MBa10S Zellen ihr Dox-abhängiges Wachstum verloren haben, da sich sowohl im angeschalteten als auch im abgeschalteten Zustand kleine Kolonien bildeten. Die Größe der Kolonien war mit denen der aktivierten Ursprungszellen (MBa10) vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

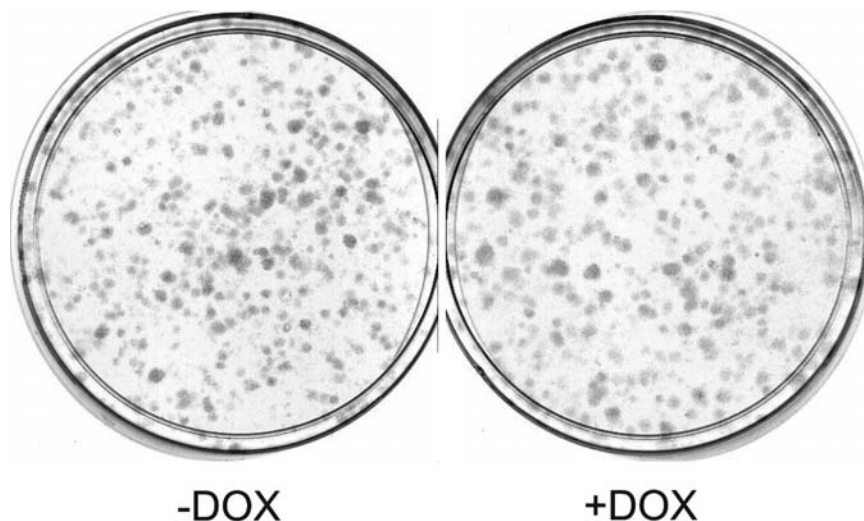


Abb. 24 Dox-abhängige Klonogenizität der MBa10S Zellen  
 $1 \cdot 10^3$  Zellen wurden pro  $55 \text{ cm}^2$  Platte ausgesät. Nach einer zweiwöchigen Kultivierung wurden die entstehenden Kolonien mit Crystal Violet angefärbt (siehe auch Abb. 8 B).

Somit scheinen die spontan aufgetretenen Mutationen ein Dox-unabhängiges Wachstum zu fördern, aber keine erhöhte Tumorigenizität zu bewirken. Allerdings kann mit den bisherigen Ergebnissen nicht geklärt werden, ob die Mutationen den Regulationsprozess so beeinträchtigen, dass TAg nicht mehr regulierbar ist und stattdessen konstitutiv exprimiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass endogene Tumorsuppressoren wie p53 oder p19Arf im Verlaufe der Kultivierung Mutationen akquirieren, wodurch die MBa10S-Zellen in ihrem Wachstum TAg-unabhängig werden.

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob auch andere Kultivierungsbedingungen Mutationen in pRITA-Zellen hervorrufen. Daher wurde analysiert, inwieweit das mehrmalige An- und Abschalten die Regulation beeinflusst oder spontane Mutationen auslöst. Dazu wurden pRITA-immortalisierte Zellen für je sieben Tage abwechselnd mit und ohne Dox kultiviert, wobei die Zellen insgesamt dreimal reprimiert und wieder reaktiviert wurden. Nach jedem Zyklus von sieben Tagen wurde die Proliferationsrate ermittelt.

Das Zellwachstum konnte während der gesamten Versuchsdauer mit Dox reguliert werden (Abb. 25 vergleiche A mit B; unterschiedliche Skalierung beachten). Allerdings stellte sich im reprimierten Zustand nach der ersten Reaktivierung ein langsames aber signifikantes Wachstum ein (Abb. 25 B). Zellen, die während der gesamten Versuchsdauer im angeschalteten Zustand kultiviert wurden, wiesen dagegen immer noch einen strikten Proliferationsstopp auf (Abb. 25 B Kontrolle). Dies deutet daraufhin, dass sich im abgeschalteten Zustand Mutationen durchsetzen, die ein Dox-unabhängiges Wachstum erlauben.

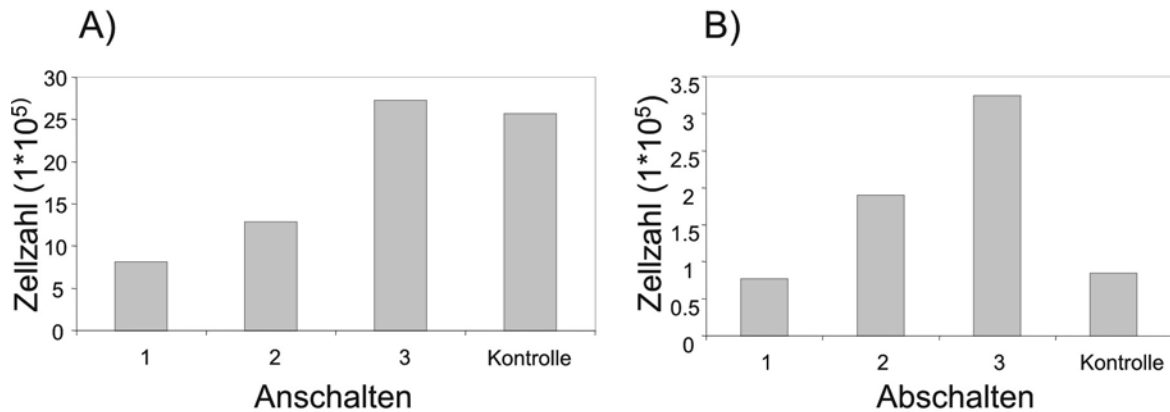


Abb. 25 Einfluss von mehrmaligem An- und Abschalten auf die Proliferation von pRITA-immortalisierten Zellen  
MBa10 Zellen wurden abwechselnd mit und ohne Dox kultiviert. Dabei wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro  $55 \text{ cm}^2$  Platte ausgesät und nach sieben Tagen die Zellzahl bestimmt. Jeweils nach dem Zählen der Zellen wurde die Kultivierungsbedingung geändert. Die Diagramme zeigen die Gesamtzellzahl und die Häufigkeit des An- beziehungsweise Abschaltens. Als Kontrolle dienten Zellen, die während des ganzen Versuches (42 Tage) nur im angeschalteten Zustand kultiviert wurden. Diese wurden anschließend ebenfalls für sieben Tage mit beziehungsweise ohne Dox kultiviert und deren Zellzahl bestimmt. Bitte die unterschiedlichen Skalen zwischen A und B beachten.

Darüber hinaus fällt auf, dass auch im aktivierten Zustand mit zunehmender Kultivierungsdauer die absolute Zellzahl, die in einer Woche erreicht wird, stark zunimmt (Abb. 25 A). Diese Zunahme ist offenbar versuchsunabhängig, da auch die Kontrollkultur eine höhere Zellzahl erreicht als zu Beginn des Versuchs (Abb. 25 A vergleiche „1“ mit Kontrolle). Dies spricht dafür, dass im angeschalteten Zustand die am schnellsten wachsenden Zellen selektiert werden.

Eine mögliche Erklärung für die auftretenden Mutationen ist die Inaktivierung des p53 durch TAG. Dieser Tumorsuppressor reguliert eine Vielzahl von DNA-Reparaturmechanismen und überwacht somit die Integrität des Genoms. Dies wird besonders in p53  $-/-$  Zellen deutlich, da diese einen instabilen Karyotyp entwickeln. Für pRITA-Zellen bestätigte eine Karyotypanalyse, dass nach viermonatiger Kultur starke chromosomale Veränderungen auftraten (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich sowohl im aktivierten als auch im reprimierten Zustand spontane Mutationen anreichern. Im angeschalteten Zustand beeinträchtigt dieser Selektionsprozeß nicht das Regulationsvermögen der Zellen, sondern es werden nur die am schnellsten wachsenden Zellen selektiert. Hingegen wird im abgeschalteten Zustand vereinzelt durch spontane Mutationen eine Dox-unabhängige Proliferation erreicht.

### 2.6.2 Sind reprimierte pRITA-immortalisierte Zellen primären Zellen ähnlich?

Mit der „DNA-Chip“-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von TAG das Genexpressionsmuster der immortalisierten Zelllinien reproduzierbar beeinflusst. Weiter wurde ein großer Unterschied im Transkriptom zwischen aktiviertem und reprimiertem



Zustand aufgezeigt. Es sollte geklärt werden, inwieweit pRITA-immortalisierte Zellen im reprimierten Zustand primären Zellen ähneln. Dazu wurde wieder eine „Clusteranalyse“ benutzt. Zusätzlich zu den in Abb. 20 gezeigten Proben wurde hierzu das Transkriptom primärer MEF analysiert. Hierfür wurden Balb/c Zellen derselben Charge der MBa10 Zellen verwendet. Diese Zellen wurden in der vierten Passage geerntet und ihre RNA isoliert. Zu dem Zeitpunkt haben die Zellen ihr Wachstum schon stark verlangsamt und ein signifikanter Anteil (10-30 %) weist morphologische Merkmale der Seneszenz auf. Zum weiteren Vergleich wurde auch das Genexpressionsmuster von spontan immortalisierten Balb/c 3T3 Zellen in Abhängigkeit von Dox untersucht. Auch diese Zellen wurden aus den gleichen Ausgangszellen wie die MBa10 Zellen generiert.

In den bisherigen Analysen wurden zwei Zustände miteinander verglichen (aktivierte mit reprimierten Zellen). Aus diesem Grund konnten für diese Experimente die Gene verwendet werden, die beim direkten Vergleich der aktivierten und reprimierten Zellen differentiell reguliert waren.

Die zusätzlichen Proben (Balb/c 3T3 sowie die primären Balb/c Zellen) machen die Analyse der Expressionsdaten komplexer, so dass die Genauswahl nicht mehr über den Vergleich zweier Zustände erfolgen kann. Deshalb wurde ein statistisches Verfahren für die Ermittlung differentiell regulierter Gene angewendet. Geeignet dafür ist die sogenannte „Analyse der Varianz“ (ANOVA) (Kerr et al., 2000), die Variationen in der Genexpression ermittelt. Dabei werden sowohl Variationen innerhalb eines Zustandes als auch zwischen den Zuständen untersucht. Voraussetzung dafür ist, dass die zu untersuchenden Zustände wenigstens als Duplikate vorliegen.

Um „ANOVA“ anwenden zu können, müssen die Proben den einzelnen Zuständen zugeordnet werden. Diese „Gruppeneinteilung“ kann aufgrund einer Hypothese erfolgen oder auf biologischen Vorwissen basieren. Zusätzlich muss ein Wert angegeben werden, den die Varianz nicht überschreiten darf. Nach „ANOVA“ ist ein Gen differentiell exprimiert, wenn seine Expression innerhalb der jeweiligen eingeteilten Gruppen nicht stärker als der gewählte Signifikanzwert variiert.

Da durch die in Kapitel 2.5 beschriebenen Experimente schon biologisches Vorwissen über die einzelnen Proben bestand, wurde dieses für die Gruppeneinteilung ausgenutzt. Die Kultivierung von spontan immortalisierten Balb/c 3T3 Zellen mit und ohne Dox zeigte, dass das Antibiotikum keinen Einfluss auf das Genexpressionsmuster hatte (siehe Kapitel 2.5.1 Tabelle 3). Daher wurden diese beiden Proben einer Gruppe zugeteilt (Abb.26A Gruppe „1“). Für die pRITA-immortalisierten Zellen konnte mit Hilfe der „Clusteranalysen“ nachgewiesen

werden, dass die reprimierten und die aktivierten Proben sich am ähnlichsten sind (siehe Kapitel 2.5.3 Abb. 22 und 23). Daher wurden sie zu je einer Gruppe zusammengefasst (Abb. 26 „+Dox“ Gruppe 2; „-Dox“ Gruppe 3). Die primären Zellen wurden nur mit einer Probe erfasst und konnten damit keiner Gruppe zugeordnet werden (Abb. 26 Gruppe 0). Diese Probe geht daher zwar nicht in die statistische Analyse der Gene ein. Dennoch kann sie später bei der Auswertung berücksichtigt werden.

A)

Gruppeneinteilung1					Willkürlich1					Willkürlich2				
Balb/c 3T3 +	1				Balb/c 3T3 +				0	Balb/c 3T3 +	1			
Balb/c 3T3 -	1				Balb/c 3T3 -	1				Balb/c 3T3 -		2		
MBa10+		2			MBa10+	1				MBa10+			3	
MBa10R+		2			MBa10R+		2			MBa10R+	1			
MBa 5+		2			MBa 5+		2			MBa 5+		2		
MBa 5R+		2			MBa 5R+		2			MBa 5R+			3	
MBa10-			3		MBa10-		2			MBa10-	1			
MBa10R-			3		MBa10R-			3		MBa10R-		2		
MBa 5-			3		MBa 5-			3		MBa 5-			3	
MBa 5R-			3		MBa 5R-			3		MBa 5R-	1			
primäre Zellen				0	primäre Zellen			3		primäre Zellen				0

B)

	p<0,01	p<0,001	p<0,0001
Anzahl der Gene für:			
Einteilung 1	5006	2514	1140
Willkürlich1	238	22	6
Willkürlich2	63	8	0

Abb. 26 Gruppeneinteilung für die „ANOVA“-Analyse

Die Fluoreszenzintensitäten aller Gene wurden in das Programm „Genesis“ importiert. Nach der Normalisierung wurden die Proben in drei Gruppen eingeteilt (A) und die Signifikanzschwelle (p) festgelegt (B). Die Proben einer Gruppe sind durch eine Zahl gekennzeichnet (1, 2 oder 3). 0 bedeutet, dass diese Probe keiner Gruppe zugeordnet wurde. Für die angegebenen Einteilungen und Signifikanzschwellen ist die Anzahl der signifikanten Gene dargestellt (B).

Die hohe Zahl der als signifikant detektierten Gene deutet daraufhin, dass die verwendete Gruppeneinteilung die Biologie der Proben gut widerspiegelt (Abb. 26 B). Allerdings ist die Genauswahl durch diese Gruppierungen mit einem Vorurteil („Bias“) behaftet. Es wird nur nach Genen gesucht, welche die Bedingungen erfüllen und in die Gruppeneinteilung passen. Um die Richtigkeit der oben beschriebenen Annahme weiter zu bestätigen, wurden als Kontrolle auch andere willkürliche Gruppeneinteilungen analysiert (Abb. 26 A). Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob diese willkürlichen Einteilungen vergleichbare Ergebnisse bei der statistischen Analyse ergeben. Dabei zeigte sich, dass für nahezu jede Gruppeneinteilung „signifikante“ Gene gefunden werden. Allerdings wurden durch die willkürlichen Einteilungen weitaus weniger differentiell regulierte Gene detektiert (Abb. 26 B), so dass die in Abb. 26 gewählte Gruppeneinteilung 1 validiert ist.

Ein Signifikanzwert von 0,01 bedeutet, dass ein Prozent der detektierten Gene durch Zufall ermittelt werden, was bei einem Chip mit 22000 Genen rund 200 zufällig ermittelte Gene bedeutete. Da dies ungefähr die Anzahl der differentiell regulierten Gene von den willkürlichen Gruppeneinteilungen darstellt, bestätigt dies, dass diese Einteilungen nicht signifikant und damit nicht valide sind. Für die oben beschriebene Gruppeneinteilung 1 heißt das, dass bei einem Signifikanzwert von  $p < 0,01$  rund vier Prozent der Gene zufällig ermittelt wurden (200/5006). Bei dem Signifikanzwert  $p < 0,0001$  reduziert sich die Zahl der zufällig gefundenen Gene auf 2 (0,0001 % von 22000), so dass für die Einteilung 1 statistisch nur 0,2 % der Gene nicht relevant sind (2/1140). Deshalb wurden für die weiteren Analysen ausschließlich die 1140 detektierten Gene des höchsten Signifikanzwertes  $p < 0,0001$  verwendet.

Zunächst wurde die Ähnlichkeit der verschiedenen Proben analysiert. Dazu wurde für die 1140 Gene des Signifikanzwertes  $p < 0,0001$  das hierarchische „Clustern“ verwendet, welches in Kapitel 2.5.3 beschrieben wurde (Abb. 27). In diese Untersuchung wurden die Genexpressionsdaten der primären Zellen miteinbezogen.

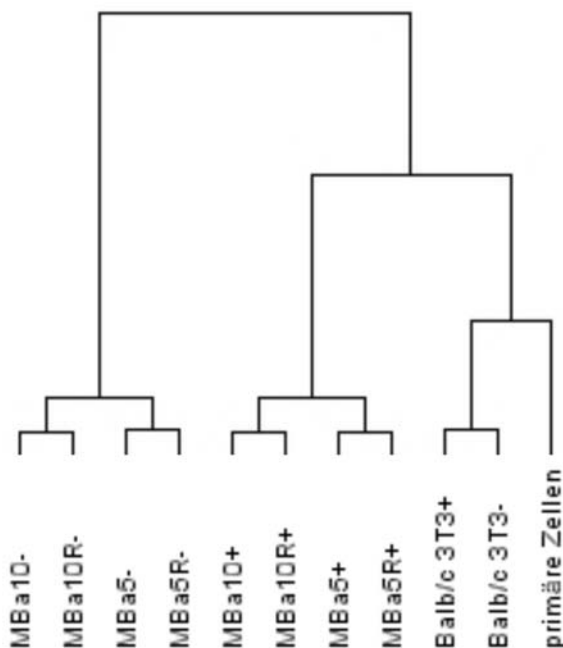


Abb. 27 „Clusteranalyse“ der einzelnen Proben  
Die Analyse ist, wie in Abb. 22 beschrieben, durchgeführt worden.

Der entstehende Baum ist aus zwei Hauptzweigen aufgebaut. Der eine Zweig umfasst die Proben der reprimierten pRITA-Zellen, während der andere weiter verzweigt ist und die restlichen Proben umfasst. Die Analyse bestätigte eine Reihe von Aussagen, die bereits vorher gemacht werden konnten: 1) Die Proben eines Klons vor und nach Reanimation weisen den größten Verwandtschaftsgrad auf. 2) Die angeschalteten- zeigen ebenso wie die abgeschalteten Zellen eine große Ähnlichkeit untereinander. 3) Die 3T3 Zellen sind am

ähnlichsten zueinander. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass 4) die spontan immortalisierten Zellen (Balb/c 3T3) den primären Zellen am ähnlichsten sind. 5) die reprimierten pRITA-Zellen die größte Entfernung zu den primären Zellen aufweisen (Abb. 27).

Daher wurden die reprimierten Zellen direkt mit den primären Balb/c Zellen verglichen und die Anzahl der differentiell regulierten Gene bestimmt (gleiche Bedingungen, wie in 2.5.1 beschrieben: mindestens zweifache Regulation; Fluoreszenzintensität muss Schwellenwert überschreiten).

	Anzahl der Gene
MBa10- mit primären Balb/c	1215
MBa10R- mit primären Balb/c	1202
MBa5- mit primären Balb/c	1255
MBa5R- mit primären Balb/c	1084
<b>in allen Vergleichen gefunden</b>	<b>597</b>

Tabelle 6 Anzahl der differentiell regulierten Gene beim Vergleich primärer Zellen mit reprimierten pRITA-Zellen

Diese Analyse zeigte, dass pro Vergleich ungefähr 10% der ca. 12700 detektierten Gene die Bedingungen erfüllen und somit differentiell exprimiert sind. Rund 600 Gene wurden in allen Vergleichen detektiert (Tabelle 6). Damit wurden mehr differentiell exprimierte Gene gefunden als in den Vergleichen zwischen aktivierten und reprimierten Zellen (siehe Tabelle 1 Kapitel 2.5.1). Dieses Resultat verdeutlicht, dass das Transkriptom der abgeschalteten Zellen nicht dem der primären Zellen ähnelt.

Problematisch ist bei dieser Analyse, den Zustand zu definieren in dem Zellen „primär“ sind, da sich die Eigenschaften frisch isolierter („primärer“) Zellen innerhalb weniger Zellteilungen *in vitro* ändern. Zu dem ist die Probe der primären Zellen ein Zellgemisch, was zu einer Mittelung der klonalen Schwankungen führt, wohingegen die pRITA-Zellen Klone sind und somit diese Schwankungen deutlich zu Tage treten. Dies könnte auch der Grund sein warum die Balb/c 3T3 Zellen, die auch aus einem Gemisch entstanden sind, der primären Probe am ähnlichsten sind (Eine ausführlichere Diskussion gibt es im Kapitel 3.5.2).

### 2.6.3 Irreversible Veränderung des Transkriptoms durch eine TAG-induzierte Immortalisierung

Es sollte ermittelt werden, ob die primären und reprimierten pRITA-Zellen sich generell voneinander unterscheiden oder ob bestimmte Gengruppen von beiden Zellen gleichermaßen exprimiert werden. Hierfür wurden die Gene nach ähnlichem Expressionsmuster gruppiert,

wobei wieder das „k-means Clustering“ verwendet wurde (in Kapitel 2.5.3 beschrieben). Mit Hilfe der Analyse konnten die Gene in 8 Gruppen eingeteilt werden (Abb. 28 A).

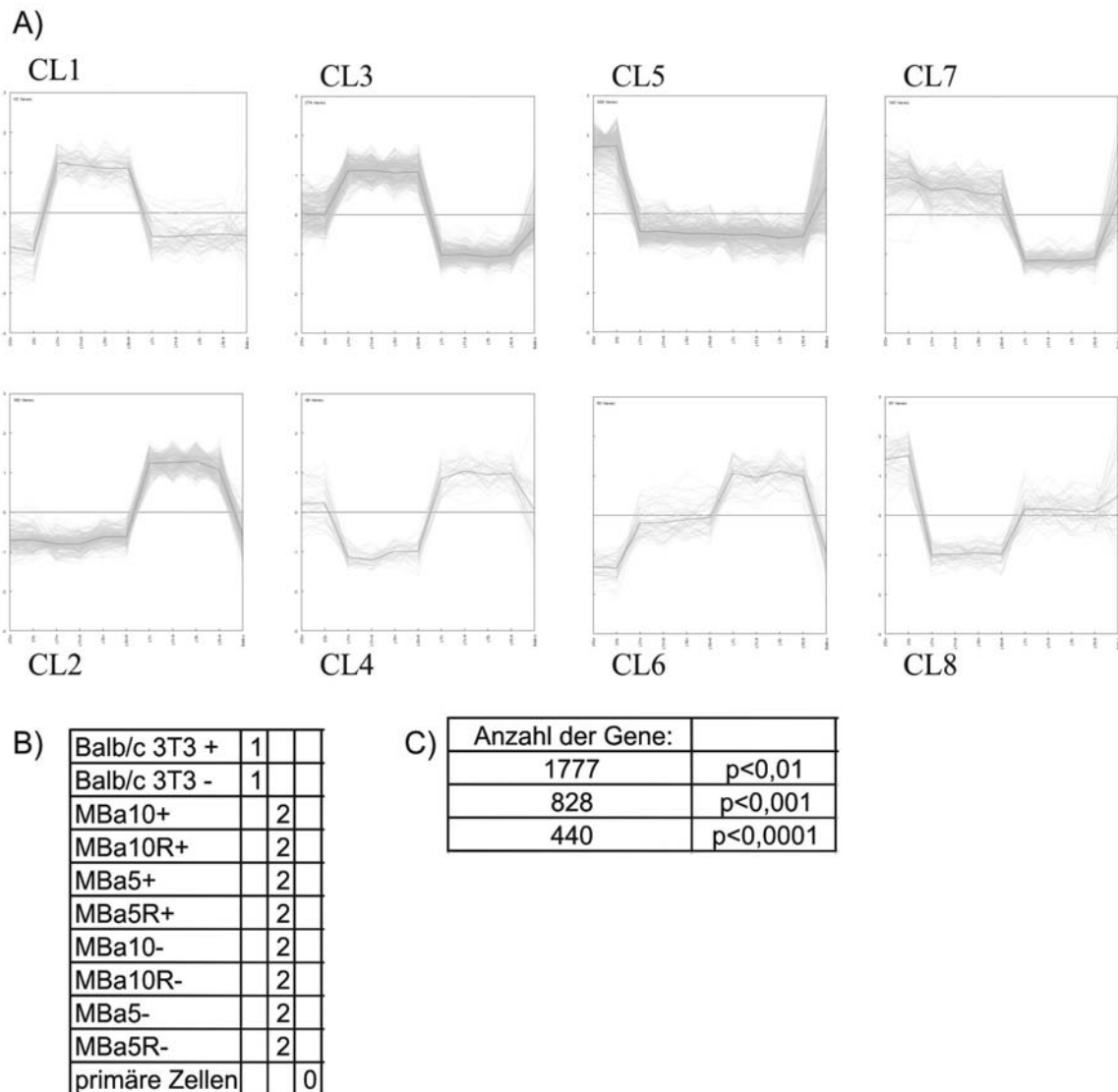


Abb.28 Molekularer Fingerabdruck durch den Immortalisierungsprozess

A) Dargestellt sind die entstehenden „Cluster“ der „k-means“ Clusteranalyse. CL5 ist eine interessante Gruppe von Genen, da diese Gene sowohl in den aktivierten als auch in den reprimierten Proben eine sehr ähnliche relative Expressionshöhe aufweisen. Auf der x-Achse sind die Proben aufgetragen (von links nach rechts: Balb/c 3T3+; Balb/c 3T3-; MBa10+; MBa10R+; MBa5+; MBa5R+; MBa10-; MBa10R-; MBa5-; MBa5R-; primäre Zellen). Auf der y-Achse ist die relative Genexpressionshöhe aufgetragen. Jedes Gen ist in dieser Darstellungsart durch eine graue Linie repräsentiert. Die dunkle Linie ist das Mittel aller Gene eines „Clusters“. Die Analyse wurde so durchgeführt wie in Abb.18 beschrieben. B) Gruppeneinteilung der Proben. Die Proben einer Gruppe sind entweder durch eins oder zwei gekennzeichnet. 0 bedeutet, dass diese Probe nicht zugeordnet wurde. C) Anzahl der signifikanten Gene bei verschiedenen Schwellenwerten und der in B) beschriebenen Gruppeneinteilung.

Dabei wurden zwei Gengruppen aufgezeigt, die bei Aktivierung von pRITA hochreguliert sind (CL1 und CL3). Ebenso wurden zwei „Cluster“ mit Genen detektiert, die bei der Inaktivierung von TAg induziert werden (CL2 und CL4). In keiner der restlichen Gruppen waren Gene, die ähnlich stark in reprimierten pRITA und primären Zellen exprimiert werden. Allerdings stach ein „Cluster“ besonders heraus, da die darin gruppierten Gene ein unerwartetes Expressionsmuster aufwiesen.

Diese Gene waren in pRITA-immortalisierten Zellen herunterreguliert, wobei überraschenderweise die relative Expressionshöhe in allen Proben der pRITA-Zellen, unabhängig davon ob aktiviert oder inaktiviert, ähnlich stark war (CL5). Die Daten deuten somit daraufhin, dass durch den Immortalisierungsprozess ein molekularer „Fingerabdruck“ in den Zellen hinterlassen wurde.

Um diesen „Fingerabdruck“ zu verifizieren, wurde eine erneute „ANOVA-Analyse“ mit einer anderen Gruppeneinteilung durchgeführt (Abb. 28 B), die auf dem „Cluster 5“ der Analyse aus Abb. 28 A basiert. Hierbei wurden die Balb/c Proben der ersten Gruppe, alle aus den pRITA-Zellen generierten Proben der zweiten Gruppe zugeordnet.

Es zeigte sich, dass 440 Gene ( $p < 0,0001$ ) dieses Kriterium erfüllen (Abb. 26C). Das anschließende „Clustering“ wies nach, dass es sowohl Gene gibt, die in pRITA-immortalisierten Zellen herunterreguliert (415) sind, als auch solche die hochreguliert (25) sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass rund 2 % der circa 22000 untersuchten Gene durch den Immortalisierungsprozess in ihrem Expressionsmuster verändert werden. Da diese Änderungen nicht von der TAg-Expression abhängig sind, können sie auch nicht revertiert werden.

Dieses Ergebnis beweist, dass die Immortalisierung mittels pRITA einen irreversiblen „Fingerabdruck“ in der Zelle hinterlässt. Somit wird eine weitere Erklärung für den großen Unterschied zwischen und primären reprimierten pRITA-Zellen geliefert.

### 3 Diskussion

Aus verschiedenen experimentellen Ansätzen zur funktionellen Genanalyse werden derzeit Mäuse generiert, in denen bestimmte Gene mutiert sind. Zunächst werden die Mäuse meist phänotypisch analysiert, bevor anschließend die molekularbiologische Analyse in den Vordergrund tritt. Gewöhnlich sind molekularbiologische Untersuchungen nur in Zellkulturexperimenten möglich. Hierbei hat die Verwendung von Zelllinien gegenüber der Verwendung von Primärkulturen entscheidende Vorteile. Zelllinien bieten homogenes Ausgangsmaterial, sie haben verglichen mit Primärkulturen konstante Eigenschaften und lassen sich leichter mit Standardmethoden genetisch manipulieren. Problematisch ist jedoch die konstitutive Expression eines immortalisierenden Gens, die für die Etablierung einer Zelllinie notwendig ist. Diese Onkogene haben meist vielfältige Effekte innerhalb der Zelle. Daher ist es durchaus möglich, dass sie auch die zu untersuchenden Signalwege beeinflussen. Mit Hilfe konditional immortalisierter Zellen, in denen die Onkogenaktivität reguliert werden kann, sollten sich solche störenden Effekte ausschließen oder zumindest reduzieren lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor pRITA zur konditionalen Immortalisierung generiert, der auf einem Tet-abhängigen Regulationssystem basiert (Gossen und Bujard, 1992). Dieses besteht aus zwei Komponenten, einem konstitutiv exprimierten Transaktivator und dem Tet-abhängigen Promotor, der die Expression des Zielgens treibt. Diese beiden Elemente befinden sich im einfachsten Fall auf verschiedenen Plasmiden, somit handelt es sich hierbei um ein binäres System. Es wurde auch ein autoreguliertes System beschrieben, welches aus zwei Komponenten besteht. Hierbei umfasste ein Plasmid den Tet-abhängigen Promoter, welcher die Expression des Transaktivators steuert, während auf dem anderen Plasmid wiederum durch den Tet-abhängigen Promoter die Transgenexpression reguliert wird (Shockett et al., 1995). Der Einfachheit halber soll diese Art von binärem System ausgeklammert werden, wenn im Verlaufe der Arbeit „das“ binäre System erwähnt wird.

Beim binären System müssen für eine konstante, regulierbare Genexpression beide Komponenten stabil in das Genom einer Zelle integriert sein, ein Vorgang, der bei primären Zellen sehr ineffizient ist. Daher wurde während dieser Arbeit ein System zur konditionalen Immortalisierung entwickelt, welches ein autoreguliertes Tet-System benutzt, bei dem Transaktivator und das Zielgen auf einem Vektor vereinigt sind (Unsinger et al., 2001). Hierbei induziert der Transaktivator seine eigene Expression und führt so zu einem positiven Rückkoppelungsmechanismus. Gleichzeitig wird auch die Expression des immortalisierenden Gens induziert. Das von Unsinger und Kollegen beschriebene System wurde dabei wie folgt modifiziert. (1) In pRITA wurde der reverse Transaktivator (rtTA2<sup>S</sup>-M2) eingesetzt, da für

diesen ein höheres Regulationspotential und niedrigere Basisaktivität beschrieben ist (Urlinger et al., 2000). (2) Als Reporter- sowie Selektionsgen wurde das Fusionsprotein eGFP/Neo verwendet. Dies befindet sich im zweiten Cistron einer bicistronischen Transkriptionseinheit (Abb. 6). (3) Aus mehreren Gründen wurde das Simian Virus 40 large T antigen (TAg) als immortalisierendes Gen ausgewählt. Erstens immortalisiert TAg sehr effizient murine Zellen und führt nicht zu deren Transformation (Jat und Sharp, 1986). Zweitens ist durch eine temperatur-sensitive Mutante des TAg bekannt, dass die TAg-induzierte Immortalisierung revertierbar ist (Jat und Sharp, 1989). Drittens konnten mit TAg eine Reihe verschiedener Zelltypen immortalisiert werden (Übersicht in Noble et al., 1995; Obinata 2001).

### 3.1 pRITA vermittelt strikte Proliferationskontrolle

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) werden sehr oft zur molekularen Analyse von Mausmutanten verwendet, da sie einfach in großer Menge und Homogenität zu gewinnen sind. Deshalb wurde untersucht, ob pRITA es ermöglicht MEF konditional zu immortalisieren. Dazu wurde der Vektor mittels Calciumphosphat transfiziert und stabil in die Zellen integriert. Die Effizienz der Immortalisierung war gering, da durchschnittlich nur ein Klon nach Transfektion von  $1 \cdot 10^6$  Zellen entstand. Zunächst wurden die selektierten Klone bezüglich ihres Regulationspotentials untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl eGFP als auch TAg nach Gabe von Doxzyklin (Dox) eine rund zehnfach höhere Expression aufwiesen (Abb. 7). Dies ist vergleichbar mit Regulationsfaktoren, die von Unsinger und Kollegen (2001) mit einem ähnlichen System detektiert wurden, wobei ebenfalls GFP-Expression analysiert wurde. Mit dem sensitiveren Reportergen Luziferase konnten die gleichen Autoren zeigen, dass das autoregulierte System auch höhere Regulationsfaktoren (bis zu 1000fache Regulation) ermöglicht (Unsinger et al., 2004). Eine Ursache für die unterschiedlichen Regulationsfaktoren liegt möglicherweise in den unterschiedlichen Sensitivitäten der verwendeten Reportergene.

Es ist auch vorstellbar, dass TAg von Zellen nur in einer bestimmten Menge toleriert wird, da es in zahlreiche zelluläre Prozesse eingreift und Signale für eine Hyperproliferation auslöst. Dies würde bedeuten, dass nur Zellen überleben, die ein bestimmtes TAg-Expressionslevel nicht überschreiten. Somit würde die TAg-Expression „gedeckelt“ und dadurch verhindert, dass höhere Expressionslevel mit pRITA erzielt werden können.

Bisher wurde das autoregulierte System hauptsächlich mit Reportergenen untersucht. Mit pRITA ist auch die Evaluierung für ein biologisch relevantes Protein möglich. Daher wurde



das Zellwachstum der aktivierten und reprimierten Zellen untersucht, wobei mehrere unabhängige Methoden verwendet wurden, um eine möglichst umfassende Charakterisierung zu erreichen: (1) die Zellzahlbestimmung zeigte, dass aktivierte Zellen ein exponentielles Wachstumsverhalten aufweisen, während reprimierte Zellen in ihrer Zellzahl konstant bleiben (Abb. 8 A). Dieses Experiment verdeutlicht die strikte, Dox-abhängige Proliferation der konditional immortalisierten Zellen. (2) der TAg-Level der pRITA-immortalisierten Zellen korreliert mit dem Zellwachstum, womit nahegelegt wird, dass die Proliferation durch pRITA kontrolliert wird. (3) Der auch im abgeschalteten Zustand geringe Anteil toter Zellen bekräftigt, dass ohne Dox tatsächlich ein Proliferationsblock und keine Apoptose induziert wird. (4) Zudem weisen an- und abgeschaltete Zellen sehr unterschiedliche Zellzyklusprofile auf. Während die aktivierten Zellen in allen Phasen des Zellzyklus verteilt sind, zeigen die reprimierten Zellen zum größten Teil einen Block in der G1/G0 Phase (Abb. 15 C). Mit Hilfe des Thymidinanalogon BrdU, welches in der S-Phase in die DNA eingebaut wird, wurde ermittelt, dass die angeschalteten Zellen den Zellzyklus innerhalb von 24 Stunden einmal durchlaufen, wohingegen die abgeschalteten Zellen nahezu keine DNA Synthese aufweisen (Abb. 17 B). In diesen Ergebnissen spiegelt sich die stringente Regulation von TAg wieder.

TAg greift mit der Inaktivierung von pRB und p53 massiv in die Kontrolle des Zellzyklusses ein. Die Inhibierung von pRB bewirkt die Aktivierung von dem Transkriptionsfaktor E2F1, welcher die Expression einer Vielzahl von Genen aktiviert, die für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklusses benötigt werden (Übersicht in Classon und Harlow, 2002). Mit der Inaktivierung von p53 werden die Kontrollpunkte des Zellzyklusses außer Kraft gesetzt und so eine ungebremschte Zellteilung ermöglicht. Wie die Resultate demonstrieren, erlaubt das transkriptionell regulierte TAg eine strikte Regulation all dieser Prozesse und damit des Zellwachstums. Überraschenderweise wird diese Stringenz nicht durch die gemessene Basalexpression von TAg beeinflusst oder herabgesetzt. Eine Erklärung dafür ist, dass die TAg-Konzentration im abgeschalteten Zustand unterhalb des Schwellenwertes liegt, der für die Induktion von Proliferation erforderlich ist (Ali und DeCaprio, 2001). Dieser Level wird offenbar in den aktivierten nicht aber in den reprimierten Zellen erreicht.

### **3.1.1 Das autoregulierte Tet-System ist entweder an- oder ausgeschaltet**

Das binäre Tet-System besteht aus zwei Komponenten, einem konstitutiv exprimierten Transaktivator und einem tet-abhängigen Promoter, welcher die Transgenexpression steuert. Die Expressionshöhe wird durch die Tetrazyklin- beziehungsweise Doxyzyklinkonzentration reguliert. Bei hohen Konzentrationen des Antibiotikums ist der Transaktivatorpool komplett abgesättigt und bewirkt eine maximale Aktivierung der Transgenexpression. Hingegen führt

die Abwesenheit des Antibiotikums zum Abschalten der Transgenexpression. Eine Eigenschaft des binären Tet-Systems ist, dass Dox-Konzentrationen unterhalb der Sättigung eine teilweise Aktivierung der Transgenexpression nach sich ziehen. Dies liegt in der partiellen Absättigung der Transaktivatormoleküle durch das Antibiotikum begründet. So wurde beispielsweise mit den Reportergenen Luziferase und eGFP nachgewiesen, dass die stufenweise Erhöhung der Antibiotikakonzentration zu einem graduellen Anstieg der Transgenexpression führt (Gossen und Bujard, 1992; Bornkamm persönliche Kommunikation).

Es wurde überprüft, ob auch das autoregulierte Tet-System eine graduelle Erhöhung der Transgenexpression ermöglicht. Dazu wurde zunächst die Proliferation der pRITA-immortalisierten Zellen bei unterschiedlichen Dox-Konzentrationen gemessen. Hierbei zeigte sich eine sigmoide Abhängigkeit zwischen Dox-Konzentration und Zellwachstum (Abb. 9), wobei die Proliferation allerdings das Expressionsverhalten einer Zellpopulation widerspiegelt. Daher kann mit dieser Art von Experiment nicht zwischen zwei möglichen Erklärungen für dieses Expressionsverhalten unterschieden werden: (1) alle Zellen zeigen eine homogene, graduelle Steigerung der Transgenexpression oder (2) ein bestimmter Anteil der Zellen wird maximal aktiviert, während die restlichen Zellen das Transgen nicht exprimieren. Durch die Dox-Konzentration würde somit der Prozentsatz der exprimierenden Zellen eingestellt.

Um dies zu untersuchen, wurde mit Hilfe des Reporters eGFP eine Analyse auf Zellebene durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei Dox-Konzentrationen unterhalb der Sättigung eine eGFP negative und eine eGFP positive Population entstand. Die Anhebung der Dox-Konzentration führte nicht zu einer graduellen Erhöhung der Expression, sondern steigerte den Prozentsatz der exprimierenden Zellen (Abb. 10). Daraus folgt, dass das autoregulierte System entweder an- oder ausgeschaltet ist und keine intermediäre Expression zulässt.

Ein Modell für dieses unterschiedliche Verhalten von autoreguliertem und binärem Tet-System liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Verfügbarkeit des Transaktivators bei suboptimalen Dox-Konzentrationen. Während beim binären System aufgrund der konstitutiven Transaktivatorexpression nur die Antibiotikakonzentration limitiert ist, unterliegen im autoregulierten System sowohl Antibiotika als auch Transaktivator einer Limitation. Diese Erklärung wird dadurch unterstützt, dass das autoregulierte System die für Aktivierung benötigte Transaktivatorkonzentration erst bei 100fach höheren Dox-Konzentrationen erreicht als das binäre System. Das binäre System wird bereits ab 1 ng/ml Dox aktiviert (Urlinger et al., 2000), während für das autoregulierte System eine Aktivierung

erst ab 100 ng/ml Dox erreicht wird (Abb. 9). Diese Dox-Konzentration führt bereits zu einer kompletten Sättigung der Transaktivatormoleküle (Urlinger et al., 2000). Daraus folgt, dass wenn das autoregulierte System den Schwellenwert der Transaktivatorkonzentration überschreitet, die Dox-Konzentration bereits so hoch ist, dass alle Transaktivatormoleküle in dieser Zelle aktiviert werden.

Veranschaulicht bedeutet dies, dass bei niedriger Dox-Konzentration die Konzentration des Transaktivators gering ist. Erst ab einer bestimmten Dox-Konzentration (100 ng/ml) ist die Aktivierung der vorliegenden (wenigen) Transaktivatormoleküle möglich. Dies geschieht in einem Teil der Zellen (stochastischer Effekt) und bewirkt, dass die Expression der autoregulierten Kassetten aktiviert wird und somit die Transaktivatorkonzentration steigt. Da die Dox-Konzentration eine komplette Sättigung der Transaktivatormoleküle bewirkt (siehe oben), wird eine vollständige Aktivierung der autoregulierten Kassette induziert. Mit höheren Dox-Konzentrationen (>100 ng/ml) steigt die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen Transaktivator und Dox und somit wird ein höherer Prozentsatz der Zellen aktiviert.

### **3.1.2 Das autoregulierte Tet-System verhält sich wie ein Hybrid aus Cre/loxP und binärem Tet-System**

Zu den am meisten benutzten Genregulationssystemen gehört neben dem bereits besprochenen transkriptionell regulierten Tet-System das Cre/loxP System (Übersicht in Sauer, 1998). Das Cre/loxP-System beruht im Gegensatz zum transkriptionell regulierten Tet-System auf Exzision des Gens durch Rekombination. Es ist aus zwei Komponenten aufgebaut, der Rekombinase Cre und den Rekombinaseerkennungsstellen loxP.

Um ein Gen mit Hilfe dieses Systems zu regulieren, muss es von zwei Erkennungsstellen der Rekombinase flankiert sein. Nach Zugabe der Rekombinase bindet diese an die entsprechenden Rekombinaseerkennungsstellen und katalysiert die Rekombination, wobei bei entsprechender Orientierung der Erkennungsstellen das Zielgen exzidiert wird. Da hier das jeweilige Gen aus dem Genom eliminiert wird, liefern Systeme dieser Art eine irreversibel ja/nein Antwort.

Die transkriptionelle Regulation mittels Tet-System und die Regulation durch Exzision mit Hilfe des Cre/loxP Systems weisen unterschiedliche Möglichkeiten bezüglich der Genregulation auf. Da beide auch verschiedene Vor- und Nachteile haben, muss je nach der zu beantwortenden Fragestellung entschieden werden, welches das geeignetere Regulationssystem ist.

Das Tet-System bietet die Möglichkeit über die Zugabe von Dox sehr einfach die Genexpression zu regulieren. Dabei ist es möglich den Regulationsschritt mehrmals zu wiederholen. Zusätzlich bietet das binäre System die Möglichkeit das Gen nur partiell anzuschalten. Allerdings weist der Tet-abhängige Promoter oftmals eine deutliche Basalexpression auf, was insbesondere bei toxischen Genprodukten ein Problem darstellt.

Im Gegensatz dazu hat das Cre/loxP System den Vorteil, dass das Abschalten der Expression nach Exzision des Gens vollständig ist. Das Hauptproblem dieses Systems besteht vielmehr darin die Expression der Rekombinase in allen Zielzellen zu erreichen und somit eine homogene Regulation zu gewährleisten. Ein mehrmaliges An- und Abschalten ist aufgrund der praktisch irreversibeln Exzision nicht möglich.

Das autoregulierte Tet-System weist Eigenschaften beider Systeme auf. Mit dem binären Tet-System hat es die einfache Regulation und Möglichkeit der mehrmaligen Regulation gemeinsam. Mit dem Cre/loxP System verbindet es, dass durch die Regulation eine Ja/Nein-Antwort in den Zellen ausgelöst wird (siehe Kap. 3.1.1).

Von Vorteil könnten diese Eigenschaften des autoregulierten Tet-Systems in transgenen Mäusen sein, da es in Mäusen unmöglich ist eine „homogene“ Dox-Konzentration einzustellen. Vielmehr bildet sich innerhalb der Maus ein Konzentrationsgradient des Antibiotikums. Für das binäre Tet-System bedeutet dies, dass je nach Gewebe und der dort vorliegenden Dox-Konzentration die Transgenexpression unterschiedlich stark angeschaltet wird. Dies kann die Deutung der Resultate erheblich erschweren. Dieses Problem wird mit dem autoregulierten Tet-System umgangen, da es keine partielle Aktivierung zulässt, sondern entweder an- oder ausgeschaltet ist. Gegenüber dem Cre/loxP hat das autoregulierte Tet-System den Vorteil, dass es mehrere Regulationszyklen zulässt.

## **3.2 Vergleich des temperatur-sensitiven TAg mit transkriptionell reguliertem TAg**

### **3.2.1 Das transkriptionell regulierte TAg erlaubt eine striktere Wachstumskontrolle als die temperatur-sensitive Mutante**

Die temperatur-sensitive Mutante des TAg (tsTAg) (Tegtmeyer, 1975) ist bei 32°C (permissive Temperatur) vollständig aktiv und immortalisiert bei dieser Temperatur primäre murine Zellen. Die Erhöhung der Temperatur auf 39°C (nicht permissive Temperatur) führt zu einer geringeren Proteinstabilität von tsTAg, wodurch es einer erhöhten Degradationsrate unterliegt (Tegtmeyer, 1975). Somit wird durch die nicht permissive Temperatur tsTAg inaktiviert.

Basierend auf tsTA<sub>g</sub> wurden Werkzeuge zur Generierung konditional immortalisierter Zelllinien geschaffen. Unter anderem wurde die retrovirale Transduktion von tsTA<sub>g</sub> etabliert (Jat und Sharp, 1989) und verschiedene transgene Mauslinien generiert, mit deren Hilfe auch rare Zelltypen immortalisiert werden konnten (Jat et al., 1991; Obinata 2001; Oostendorp et al., 2002). Da dieses System die Standardmethode ist, um konditional immortalisierte Zelllinien zu etablieren, wurde es in der vorliegenden Arbeit mit dem transkriptionell regulierten TA<sub>g</sub> verglichen. Dazu wurden auch MEF mit tsTA<sub>g</sub> immortalisiert. Um die Variabilitäten für den Vergleich möglichst gering zu halten, wurden MEF des gleichen Inzuchtstammes sowie der gleichen Charge verwendet, mit denen auch die pRITA-immortalisierten Zelllinien MBa5 und MBa10 generiert wurden.

In den mit tsTA<sub>g</sub> etablierten Zelllinien wurde die Proteinkonzentration von tsTA<sub>g</sub> bei der permissiven (32°C), bei der nicht permissiven (39°C) und bei der physiologischen (37°C) Temperatur mittels Immunofluoreszenz untersucht (Abb. 12 A). Dabei stellte sich heraus, dass mit steigender Temperatur die Konzentration von tsTA<sub>g</sub> abnimmt. Diese Abnahme wird wahrscheinlich durch die angesprochene erhöhte Instabilität und damit verbundene schnellere Degradation von tsTA<sub>g</sub> verursacht.

Allerdings weisen tsTA<sub>g</sub>-Zellen unter nicht permissiven Bedingungen (39°C) verglichen mit reprimierten pRITA-Zellen (-Dox) einen höheren TA<sub>g</sub>-Level auf. Dies kann damit erklärt werden, dass pRITA einen transkriptionellen Regulationsmechanismus benutzt, wodurch kein TA<sub>g</sub> mehr gebildet wird, wenn pRITA abgeschaltet ist. Im Gegensatz dazu wird tsTA<sub>g</sub> posttranslational reguliert. tsTA<sub>g</sub> wird konstitutiv exprimiert und erst als Protein inaktiviert, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen neu translatierten und inaktivierten Proteinen einstellt.

Die Inaktivierung von tsTA<sub>g</sub> konnte indirekt über die geringere Proliferationsrate bei der nicht permissiven Temperatur (39°C) gezeigt werden (Abb. 11). Allerdings wies keine der mit tsTA<sub>g</sub> etablierten Zelllinien einen kompletten Proliferationsblock auf, so wie er bei den pRITA-immortalisierten Zelllinien beobachtet wurde. Es ist zwar in der Literatur beschrieben, dass auch mit Hilfe von tsTA<sub>g</sub> eine solch strikte Regulation möglich ist, aber gleichzeitig wurde bei diesem System eine starke klonale Variation bezüglich der Regulation nachgewiesen (Jat und Sharp, 1989).

Dass keine stringent regulierbare Zelllinie mit tsTA<sub>g</sub> generiert werden konnte, kann an der zu geringen Anzahl analysierter Klone (insgesamt 8) gelegen haben. Dies würde bedeuten, dass verglichen mit pRITA (70% der Klone sind strikt reguliert), die Effizienz der Regulation beim tsTA<sub>g</sub> deutlich geringer ist. Eine andere Erklärung wäre, dass nicht optimale Bedingungen für

die tsTA<sub>g</sub>-vermittelte Immortalisierung verwendet wurden. Diese könnten beispielsweise zusätzliche spontane Mutationen hervorrufen, die das Wachstum bei höheren Temperaturen ermöglichen. Dies würde bedeuten, dass tsTA<sub>g</sub>-System störungsanfälliger ist.

### **3.2.2 Die nicht permissive Temperatur (39°C) ruft starke klonale Variationen in der Proliferation hervor**

Die Proliferationsrate der tsTA<sub>g</sub>-immortalisierten Zellen ist bei 37°C am größten, obwohl die Zellen einen niedrigeren TA<sub>g</sub>-Level aufweisen als bei 32°C. Damit scheint neben dem Onkogen auch die Temperatur entscheidend das Zellwachstum zu beeinflussen. Kontrollexperimente mit pRITA- und spontan immortalisierten Zellen bestätigten die Annahme, dass eine Kultivierungstemperatur von 37°C eine optimale Proliferation der Zellen ermöglicht, wogegen 32°C und 39°C suboptimale Kultivierungsbedingungen sind. Bei der niedrigeren Temperatur wurde in Zelllinien, unabhängig von der Art ihrer Immortalisierung, ein deutlich verlangsamtes Zellwachstum beobachtet. Ein Grund dafür dürfte die geringere metabolische Aktivität der Zellen sein. Dieses Phänomen ist nicht neu. Es wird beispielsweise in der Biotechnologie verwendet, um durch das verlangsamte Wachstum der Zellen deren Produktionsphase zu verlängern (Kaufmann et al., 2001; Schatz et al., 2003). Ein positiver Nebeneffekt hierbei ist, dass die Zellen auch ihre Produktivität steigern.

Würden die Zellen rein den Gesetzen der Thermodynamik folgen, müssten sie bei 39°C die größte Proliferationsrate aufweisen. Allerdings wurden bei dieser Kultivierungstemperatur starke klonale Schwankungen im Wachstumsverhalten festgestellt (Abb. 13). Auch dieses Verhalten wurde unabhängig von der Immortalisierungsart in pRITA-, in spontan und auch in tsTA<sub>g</sub>-immortalisierten Zellen beobachtet.

Damit scheint das Hauptproblem des tsTA<sub>g</sub> in den erforderlichen suboptimalen Temperaturen zu liegen. Dieses Problem wird mit Hilfe des transkriptionell regulierten TA<sub>g</sub> umgangen. Darüber hinaus haben die verschiedenen Experimente mit den spontan immortalisierten Balb/c 3T3 Zellen bewiesen, dass die verwendete Dox-Konzentration die Zellen nicht beeinflusst (Proliferation Abb. 8 C, Genexpressionsmuster Tab.3). Somit bietet pRITA eine striktere Proliferationskontrolle mit weniger Nebenwirkungen durch den Regulationsschritt.

### 3.3 Analyse der zellulären Stadien von aktivierten und reprimierten pRITA-Zellen

#### 3.3.1 pRITA immortalisiert MEF ohne sie zu transformieren

Sowohl transformierte als auch immortalisierte Zellen weisen ein unbeschränktes exponentielles Wachstumsverhalten auf. Sie unterscheiden sich lediglich in der Fähigkeit Tumore zu bilden (Tumorigenizität).

Dieser Unterschied manifestiert sich auch auf molekularer Ebene. Bereits in den frühen Achtzigern konnte gezeigt werden, dass für die Transformation von primären murinen Zellen die Aktivität zweier kooperierender Onkogene (c-myc und h-ras) benötigt wird (Land et al. 1983). Eine Immortalisierung kann hingegen mit einem einzigen Onkogen beziehungsweise durch Ausschalten eines Tumorsuppressors erreicht werden, wie Studien mit p53 <sup>-/-</sup> und p19Arf <sup>-/-</sup> MEF beweisen (Kamijo et al., 1997; Sharpless et al., 2004). Dies wurde durch weitere Studien bestätigt, die Antisense RNA gegen p53 und p19ARF verwendeten, um diese zu inaktivieren (Carnero et al., 2000). Auch die Überexpression von BMI1 oder CBX7, beides transkriptionelle Repressoren der Polycomb-Gruppe, bewirkt die Immortalisierung von MEF (Gil et al., 2004). Da alle beschriebenen Onkogene zur Inaktivierung von p53 führen (Abb.29), scheint dies ein entscheidender Schritt bei der Immortalisierung von MEF zu sein.

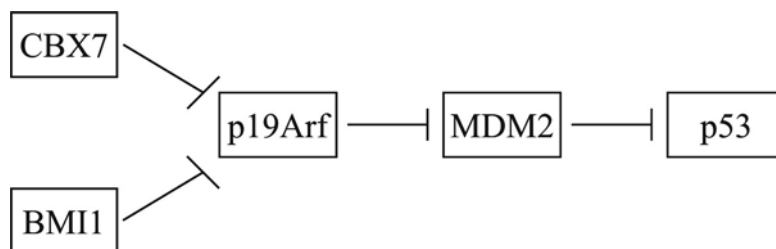


Abb.29 Vereinfachte Darstellung des Signalweges „upstream“ von p53.

Beide Repressoren der Polycomb-Gruppe inaktivieren p19Arf und lassen eine Aktivierung von MDM2 zu. Dies führt zu der beschriebenen Inaktivierung von p53.

Dass dies kein generelles Dogma ist, sondern auch vom Zelltyp abhängt, zeigt eine Studie in Makrophagen. Diese Zellart konnte nicht durch die alleinige Inaktivierung von p19ARF immortalisiert werden. Hierfür war auch die Inaktivierung von p16Ink4a (wirkt auf pRB) nötig. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in Endothelzellen, Keratinozyten und Herzmuskelzellen gemacht (Randle et al., 2001). Somit variieren die molekularen Bedingungen für eine Immortalisierung in den verschiedenen Zellarten einer Spezies.

Es sollte die Frage geklärt werden, ob die pRITA-immortalisierten Zellen tatsächlich nur immortalisiert und nicht transformiert sind. Dazu wurde die Tumorigenizität der aktivierten pRITA-Zellen mit verschiedenen *in vitro* Assays untersucht. Wie sich dabei heraus stellte,

haben diese Zellen nur ein geringes tumorigenes Potential (Abb. 16). Dieses konnte durch die konstitutive Expressierung des v-Ha-ras Onkogen stark erhöht werden. Dies bedeutet, dass pRITA-immortalisierte Zellen tatsächlich nur immortalisiert sind.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch schon für ein konstitutiv exprimiertes TAg beschrieben (Jat und Sharp, 1986). Im Gegensatz dazu transformiert TAg bereits etablierte Zelllinien wie beispielsweise NIH 3T3 Zellen (Saenz-Robles et al., 2001). Die Ursache dafür dürfte sein, dass diese Zellen bereits eine Mutation in einem Tumorsuppressor haben und TAg somit das „zweite“ kooperierende Onkogen ist. Unterstrichen wird dies durch die oben beschriebenen Resultate mit dem v-Ha-ras Onkogen sowie anderen Studien, bei den ebenfalls die Kooperativität von v-Ha-ras und TAg in der Transformation primärer Zellen gezeigt wurde (Cavender et al., 1995, Beachy et al., 2002).

### 3.3.2 Seneszenz

Seneszenz wurde zunächst als Zustand beschrieben, bei dem primäre Zellen ihr Replikationslimit erreicht haben („Hayflick Limit“)(Hayflick und Moorehead, 1961). Die genaue Ursache für den Stopp der Proliferation ist nicht bekannt, wobei es Hinweise darauf gibt, dass der Proliferationsarrest durch verkürzte Telomere hervorgerufen wird. Telomere sind die Enden linearer Chromosomen, die in Säugerzellen aus der einfachen Basenabfolge „TTAGGG“ bestehen, welche sich mehrere hundert bis tausendmal wiederholt. Da die Chromosomenenden bei der DNA Replikation nicht vollständig kopiert werden können, verkürzen sie sich mit jeder Zellteilung um rund 200 Basenpaare. Dieser Prozess wird nur bis zu einer bestimmten Telomerlänge toleriert, wird diese unterschritten, wird ein Proliferationsarrest ausgelöst, der auch replikative Seneszenz genannt wird. Die replikative Seneszenz kann durch die Expression der Telomerase verhindert werden, da dieses Enzym die Telomerlänge durch Anfügen von „TTAGGG“-Sequenzwiederholungen aufrechterhält (Bodnar et al., 1998).

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die replikative Seneszenz nur ein Sonderfall der Seneszenz ist. Seneszenz wird auch durch eine Vielzahl anderer Stimuli ausgelöst. Unter ihnen sind: DNA-Schäden (te Poele et al., 2002), oxidativer Stress (Parrinello et al., 2003) und auch Onkogene, wie beispielsweise v-Ha-ras (Serrano et al., 1997).

Unabhängig vom induzierenden Stimulus scheint die Aktivierung von p53 und dessen Zielgen p21 notwendig zu sein, um Seneszenz auszulösen (Übersicht in Shay und Roninson, 2004). Was wird durch p21 induziert? Diese Frage konnte bisher auch nicht mit der Verwendung von „DNA-Chips“ eindeutig beantwortet werden (Chang et al., 2000; Chang et al., 2002). Geklärt ist, dass p21 zwar zur Induktion der Seneszenz nicht aber für deren Aufrechterhaltung



benötigt wird (te Poele et al., 2002). Dies wird scheinbar durch epigenetische Mechanismen bewerkstelligt, welche wahrscheinlich durch p16Ink4a ausgelöst werden. Dabei bilden sich sogenannte „Seneszenz assoziierte Heterochromatinfoci (SAHF)“, welche die Seneszenz irreversibel in den Zellen manifestieren (Narita et al., 2003).

### 3.3.3 Reprimierte pRITA-Zellen sind seneszent

Die Inaktivierung von tsTA<sub>g</sub> bei der nicht permissiven Temperatur löst Seneszenz aus (Jat und Sharp 1989; Larsson et al., 2004). Dies ist damit erklärbar, dass die Zellen vor und während des Immortalisationsprozesses so viele Zellteilungen durchlaufen, dass sie bereits ihr Replikationslimit erreicht haben. Somit sind sie für weiteres Wachstum auf die Expression von TA<sub>g</sub> angewiesen. Wird dieses inaktiviert, wird demnach auch die Proliferation verhindert und ein Proliferationsarrest induziert (Ikram et al., 1994).

Da auch pRITA-Zellen nach Abschalten der TA<sub>g</sub>-Expression einen permanenten Wachstumsstopp vollziehen (Abb. 8 A), wurde überprüft, ob es sich hierbei um Seneszenz handelt. Der am häufigsten verwendete Marker für die Detektion seneszenten Zellen ist die SA- $\beta$ -Gal Färbung (Dimri et al., 1995), wobei eine intrinsische  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität der Zellen ausgenutzt wird. Da die Spezifität dieses Markers fraglich ist (Severino et al., 2000), müssen/sollten für eine eindeutige Bestimmung von Seneszenz auch andere Merkmale erfüllt werden.

Dies ist für die pRITA-immortalisierten Zelllinien erfüllt: pRITA-Zellen weisen eine positive SA- $\beta$ -Gal Färbung neun Tage nach deren Reprimierung aus (Abb. 17 A). Darüber hinaus verändern pRITA-Zellen auch nach Dox-Entzug ihre Morphologie, was mit einer Erhöhung der Granularität einhergeht (Daten nicht gezeigt). Weiterhin weisen sie neben dem Wachstumsstopp auch praktisch keine DNA-Synthese mehr auf (Abb. 17 B). All diese Ergebnisse demonstrieren eindeutig, dass pRITA-Zellen einige Tage nach Abschalten der TA<sub>g</sub>-Expression seneszent werden.

Auch die Transkriptomanalyse bestätigte, dass die reprimierten pRITA-Zellen seneszent sind. So wurde durch die „Gene Ontology“ Analyse eine vermehrte Expression von Genprodukten aufgezeigt, die in die Kategorien „Membran“, „Vakuole“ und „Lysosomen“ fallen (Abb. 21). Diese wurden im Zusammenhang mit Seneszenz auch in anderen Studien beobachtet. Beispielsweise wurde für seneszente Fibroblasten ebenfalls über Genexpressionsanalyse nachgewiesen, dass Membranproteine in diesem Zustand stark exprimiert werden (Zhang et al., 2003). Auch die vermehrte Expression lysosomaler Proteine konnte bereits mit Seneszenz in Verbindung gebracht werden (Dimri et al., 1995). Die oben angesprochene erhöhte

Granularität seneszenten Zellen könnte mit der Überrepräsentation von Genprodukten erklärt werden, die mit Vesikeln assoziiert sind (Vakuole und Lysosomen).

Die reprimierten pRITA-Zellen wiesen erst nach neun Tagen eine deutliche SA- $\beta$ -Gal Färbung auf. Hingegen wurden für die Expressionsanalyse Proben von Zellen verwendet, die nur für drei Tage abgeschaltet waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Seneszenz schon frühzeitig nach Inaktivierung von TAg manifestiert wird. Es scheint aber ein paar Tage zu dauern bis sich der zelluläre Zustand komplett in Richtung Seneszenz verändert hat und durch Marker wie SA- $\beta$ -Gal detektiert werden kann. Diese These wird weiter dadurch bekräftigt, dass durch die Inaktivierung von TAg p53 aktiviert wird. Hierdurch wird unter anderem p21 stark exprimiert (Tabelle 4), welches für die Induktion der Seneszenz verantwortlich ist (s.o.).

Somit kann zusammengefasst werden, dass durch Inaktivierung von TAg die Zellen seneszent werden. Anfangs wird dieser Prozess von p53 und p21 initiiert, die über unbekannte Mechanismen den permanenten Proliferationsarrest sowie die morphologischen Änderungen einleiten.

### **3.3.4 Revertierung der Seneszenz in pRITA-immortalisierten Zellen**

Laut Definition haben seneszente Zellen ihr Replikationslimit erreicht und befinden sich in einem irreversiblen Proliferationsarrest. Allerdings zeigten zwei Studien, dass durch genetische Manipulation auch dieser eigentlich irreversibel Zustand revertiert werden kann. Hierbei scheint ähnlich wie bei der Immortalisierung die Inaktivierung von p53 eine wichtige Rolle zu spielen. So wurden seneszente Zellen sowohl mit Hilfe einer siRNA gegen p53 (Dirac und Bernards, 2003) als auch mit einer dominant negativen Mutante von p53 (Beausejour et al., 2003) zur Proliferation reanimiert. Letztere Studie zeigte zusätzlich auf, dass in humanen Zellen unterschiedliche Seneszenzprogramme auftreten. Zellen, die keine p16Ink4a Expression aufwiesen, konnten reanimiert werden, während Zellen mit p16Ink4a Expression einen wirklich irreversiblen Wachstumsarrest aufweisen. Dies kann mit den Ergebnissen einer anderen Studie erklärt werden, die zeigten, dass p16Ink4a essentiell für die Ausbildung sogenannter „Seneszenz assoziierter Heterochromatinfoci“ ist (Narita et al. 2003). Es wurde ermittelt, ob auch in pRITA-immortalisierten Zellen die Revertierung der Seneszenz möglich ist (Abb. 18). Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung der TAg-Expression offensichtlich ausreicht, um die Zellen zur Proliferation zu reanimieren. Allerdings wurde festgestellt, dass nur ein Teil der Zellen wieder zur DNA Replikation angeregt werden kann. Dies ist insofern erstaunlich, da Dox in allen Zellen in der gleichen Konzentration vorhanden sein und somit eine homogene Reanimation bewirken sollte. Darüber hinaus wurde mit der

Korrelation zwischen DNA-Replikation und eGFP-Expressionsdaten nachgewiesen, dass während der Reanimation nur in einem Teil der Zellen die Transgenexpression wieder angeschaltet werden kann (Tabelle 1). Weiterhin sinkt mit länger andauernder Reprimierung oder bei zusätzlichen Stress der Anteil der reanimierbaren Zellen (Tabelle 2; Abb. 19). Zusammenfassend sprechen diese Resultate dafür, dass auch in murinen Zellen epigenetische Mechanismen induziert werden können, welche die Seneszenz irreversibel manifestieren.

### **3.4 Genexpressionsanalyse mittels „DNA-Chips“**

#### **3.4.1 Experimentelles Vorgehen und Möglichkeiten der Genexpressionsanalyse**

Mit Hilfe von „DNA-Chip“ Experimenten kann die Expression einer Vielzahl von Genen gleichzeitig erfasst werden. Diese Methode generiert eine große Datenmenge, die von vielen Faktoren beeinflusst wird. So beeinflussen unter anderem Geschlecht, Inzuchtstamm und Zellcharge das Genexpressionsprofil. Allerdings haben auch technische Aspekte Auswirkungen auf das Transkriptom. Hierzu zählen beispielsweise die RNA-Isolation oder die Charge der „DNA-Chips“. Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass „DNA-Chips“ verschiedener Hersteller bei der gleichen Probe stark voneinander abweichende Genexpressionsmuster detektierten (Tan et al., 2003).

Daher wird für Experimente mit „DNA-Chips“ die Verwendung von Replikaten dringend empfohlen (Lee et al., 2000). Unterschieden werden technische (gleiche Probe zweimal vermessen; Beispiel für pRITA-Zellen: zweimal MBa10+ vermessen) und biologische Replikate (zwei unabhängige, gleich behandelte Proben; Beispiel für pRITA-Zellen: MBa5+ und MBa10+). Dabei ist die Variabilität zwischen technischen geringer als zwischen biologischen Replikaten. Bei einer Studie, die den Einfluss von c-Myc auf das Genexpressionsprofil analysierte, wurden beispielsweise zwischen biologischen Replikaten 130 differentiell regulierte Gene gefunden, während es bei den technischen Replikaten nur 13 waren (rund 6400 Gene analysiert)(Coller et al., 2000).

Am häufigsten werden „DNA-Chip“ Experimente derzeit genutzt, um anhand von differentieller Expression Gene zu identifizieren, die an dem zu untersuchenden Prozess beteiligt sind. Die dabei möglichen Fragestellungen sind vielfältig und reichen von der Identifizierung an Signalwegen beteiligter Gene bis hin zur Identifizierung von Effektorgenen eines Transkriptionsfaktors.

Neben der Identifizierung differentiell exprimierter Gene kann die „DNA-Chip“ Analyse auch zum Vergleich verschiedener Proben genutzt werden. Gewöhnlich wird dabei das

Genexpressionsmuster der verschiedenen Proben analysiert und diese daraufhin nach ihrer Ähnlichkeit gruppiert.

Unter anderem nutzte eine Studie diese Methode aus, um B-Zell Lymphome zu untersuchen. Dabei konnten mittels Clusteranalyse zwei molekular unterschiedliche Subtypen dieser Tumorart identifiziert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese Subtypen auch auf eine Therapie unterschiedlich reagieren (Alizadeh et al., 2000).

Eine vom National Institute of Health initiierte Studie analysierte das Transkriptom von 60 humanen Krebszelllinien. Mit Hilfe des „Clustering“ wurde gezeigt, dass sich die Zelllinien gruppierten, deren Ursprung dasselbe Gewebe war. Hierbei traten auch bisherige Fehlklassifizierungen einiger Zelllinien zu Tage. Weiterhin konnte über den Vergleich von normalen Gewebe mit den Zelllinien festgestellt werden, dass diese erkennbare „Expressionsmotive“ des normalen Gewebes besitzen (Ross et al., 2000).

Somit stellen die „DNA-Chip“-Analysen eine wesentliche Ergänzung zu den traditionellen Charakterisierungsmethoden dar.

### **3.4.2 Einfluss der TAg-Regulation: globale Einflüsse**

Auch wenn Replikate bestimmt wurden und das „DNA-Chip“ Experiment sorgfältig geplant wurde, sind die erhaltenen Daten meist immer noch sehr komplex und mit einer gewissen Schwankung behaftet. Daher ist es sinnvoll neben den Expressionsdaten zusätzliche biologische Informationen für die Analyse zu verwenden. Eine solche Strategie wurde beispielsweise verwendet, um Gene zu identifizieren, die bei der Entstehung von Fettsucht eine Rolle spielen (Schadt et al., 2003). Hierbei wurde die Transkriptomanalyse gekoppelt mit einer gleichzeitigen chromosomalen Lokalisierung der Gene. Somit konnten genomische Orte ermittelt werden, die bei übergewichtigen Mäusen verstärkt exprimiert werden.

Eine andere Studie machte sich die Annotationen des „Gene Ontology“ Konsortiums (Ashburner et al., 2000) zu Nutze. Dabei wurde die circadische Genexpression zweier Gewebe mittels „DNA-Chips“ untersucht. Die „Gene Ontology“ Analyse half dabei biologische Prozesse zu ermitteln, die in einem der beiden Gewebe vermehrt eine solche circadische Genexpression aufwiesen (Storch et al., 2002).

Die Genexpressionsanalyse der pRITA-Zellen wurde ebenfalls in mehreren Schritten durchgeführt. Zunächst wurden die Gene ermittelt, die im an- und abgeschalteten Zustand differentiell exprimiert waren. Um generelle Motive der TAg-Induktion zu ermitteln, wurden deshalb nur Gene für die weiteren Analysen verwendet, die in allen Vergleichen zwischen induzierten und reprimierten Zellen detektiert wurden (Tabelle 3). Dabei wurden sehr strikte Bedingungen gewählt, die ein Gen erfüllen musste, um als differentiell exprimiert zu gelten.

So musste mindestens eine zweifache Regulation vorliegen. Zusätzlich musste das Gen einen Expressionsschwellenwert überschreiten, um von der Analyse erfasst zu werden

Trotzdem war die Zahl der differentiell regulierten Gene mit rund 500 immer noch sehr groß (Tabelle 3). Deshalb wurden im nächsten Schritt die Expressionsdaten mit der „Gene Ontology“ Annotation verknüpft. Dies sollte einen besseren Überblick über die in der Zelle ablaufenden Prozesse geben. Der Vergleich der aktivierten und reprimierten pRITA-Zellen mit dieser Analyseart bestätigte, dass sich die Zellen in gegensätzlichen Zuständen befinden (Abb. 21). Diese Unterschiede manifestieren sich allerdings nur in wenigen Kategorien (biologische Prozessen, Kompartimente). Nicht überraschend werden in aktivierten, proliferierenden Zellen verstärkt Gene des Zellzyklusses und der damit verbundenen Prozesse (RNA- und DNA-Metabolismus) exprimiert, wobei ein Großteil dieser Prozesse erwartungsgemäß im Kern abläuft. Dagegen wurden in reprimierten Zellen mit Lysosomen, Membran und Vakuole, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, molekulare Marker der Seneszenz detektiert.

Somit konnte mit dieser groben Analyse bereits nachgewiesen werden, dass die Transkriptomanalyse sehr gut die beobachteten zellulären Phänotypen beschreibt. Darüber hinaus wurde die große Differenz der beiden Zustände aufgezeigt und auch näher charakterisiert.

### **3.4.3 Einfluss der TAg Regulation auf das Transkriptom: Analyse auf Genebene**

Die Beobachtungen wurden mit einer Analyse auf Genebene unterstützt (Tabelle 4). Hierbei trat unter anderem der starke Effekt des E2F-1 auf das Transkriptom der aktivierten Zellen zu Tage. Dieser Transkriptionsfaktor wird indirekt durch TAg aktiviert und induziert die Expression einer Vielzahl von Genen, die für den Zellzyklus essentiell sind (Übersicht in Harbour und Dean 2000). Zwar wurde E2F-1 nicht differentiell exprimiert, seine Aktivierung konnte aber dennoch nachgewiesen werden, da einige seiner Zielgene induziert wurden (Tabelle 4).

Auf der anderen Seite wird bei der Analyse der Expressionsdaten deutlich, dass in den reprimierten Zellen durch die Inaktivierung von TAg p53 aktiviert wird. Die Aktivierung von p53 wird durch die starke Induktion von p21 und MDM2 (siehe auch Abb. 2) verdeutlicht, aber auch andere p53 Zielgene (Übersicht in Vousden und Lu, 2002) sind differentiell exprimiert, wie zum Beispiel Perp und Apaf1 (Apoptose), BTG2 (DNA Reparatur) oder Cyclin G1 (p53 Stabilisierung) (Tabelle 4).

Natürlich wurde nur ein Teil der in der Literatur beschriebenen Zielgene von E2F-1 und p53 auch als differentiell reguliert gefunden. Dies hat mehrere Ursachen, so waren die

Auswahlkriterien (zweifache Induktion und Überschreiten eines Schwellenwertes) für eine differentielle Expression sehr strikt. Beispielweise Cyclin E1 oder E2F-1 waren in allen Vergleichen mindestens zweifach reguliert, allerdings erreichten sie nicht immer den Schwellenwert. Weiterhin sind viele Gene zu schwach exprimiert, um sie mit den „DNA-Chips“ zu detektieren. Dies bedeutet, dass diese Methode nicht sensitiv genug ist, um alle bekannten Effekte nachzuweisen. In diese Kategorie fallen oftmals Transkriptionsfaktoren, die nur in sehr geringen Konzentrationen von der Zelle benötigt werden.

Ein weiterer Grund ist, dass nicht alle Gene auf dem „DNA-Chip“ vertreten sind, so fehlt zum Beispiel das Gen Nbs1. Dieses wird durch TAG inaktiviert, um so die virale Replikation zu ermöglichen (Wu et al., 2004).

Darüber hinaus werden manche Gene nur in bestimmten Zelltypen durch E2F-1 oder p53 aktiviert, so dass man in Fibroblasten nur von einem Bruchteil der Gene differentielle Expression erwarten kann. Dies gilt auch für Gene, die während der Seneszenz hochreguliert sind, da das Transkriptom dieses Zustandes stark zwischen den Zelltypen variiert (Shelton et al., 1999; Zhang et al., 2003).

Ein anderer Punkt ist, dass beispielweise p53 Apoptose oder Seneszenz induzieren kann. Hierfür werden jeweils andere Effektorgene benötigt. Dies ist gleichbedeutend damit, dass die Induktion von Genen auch von der Wahl des zu induzierenden Prozesses abhängt.

Insgesamt konnte somit mit der Analyse der differentiell exprimierten Gene bestätigt werden, dass für die TAG induzierte Immortalisierung hauptsächlich die Aktivierung von E2F-1 sowie die Inaktivierung von p53 verantwortlich ist.

#### **3.4.4 An- und Abschalten der mit pRITA-immortalisierten Zellen ruft nahezu identische Änderung im Genexpressionsprofil hervor**

Die Vergleiche zwischen den Proben vor und nach Reanimation liefern eine Reihe wichtiger Ergebnisse. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Probengenerierung und die „DNA-Chip“ Analyse unter reproduzierbaren, definierten Bedingungen ablief. Dies spiegelt sich darin wider, dass das Transkriptom vor und nach einer dreiwöchigen Kultivierungsphase übereinstimmt (Tabelle 5). Diese hohe Übereinstimmung ist im Hinblick auf die obengenannten Faktoren (Kap. 3.4.1) nicht zu erwarten gewesen.

Daher lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass die äußeren Faktoren bei der Analyse weitgehend konstant gehalten wurden und somit das Transkriptom nicht beeinflussten. Weiterhin bedeutet dies, dass die detektierten regulierten Gene ausschließlich durch pRITA induziert worden sind.

Überraschenderweise werden durch pRITA nach Reanimation nicht nur dieselben Gene induziert oder reprimiert. Vielmehr induziert der Vektor auch nahezu identische Änderungen in der Genexpressionshöhe (Abb. 23). Dies legt den Schluss nahe, dass die durch TAG induzierten Änderungen auf molekularer Ebene revertiert werden können.

Allerdings wurde auch gezeigt, dass durch Induktion der Seneszenz Mutationen von pRITA-Zellen akquiriert werden, die im abgeschalteten Zustand zu einem kleinen aber signifikanten Anstieg der Zellzahl führen (Abb. 25 B). Trotzdem ist das Genexpressionsmuster nach der Reanimation nicht signifikant verändert. Dies kann daran liegen, dass die induzierten Mutationen zu heterogen sind und somit nicht durch die „DNA-Chip“ Analyse detektiert werden können. Diese Mutationen treten offenbar nur in einem kleinen Teil der Zellen auf (MBa10S-Zellen; Kapitel 2.6.1), so dass mit der Genexpressionsanalyse wahrscheinlich das Transkriptom der nicht proliferierenden pRITA-Zellen aufgenommen wird, da diese mindestens 90 % der Kultur darstellen. Damit muss festgehalten werden, dass die TAG induzierten Änderungen zwar auf molekularer Ebene revertiert werden können, allerdings nicht in 100 % der Zellen.

### **3.5 Weitere Eigenschaften der pRITA-Zellen**

#### **3.5.1 pRITA-Zellen sind genetisch nicht stabil**

Es wurde sowohl für an- als auch für abgeschaltete pRITA-Zellen das Entstehen zusätzlicher Veränderungen nachgewiesen. Die im aktivierten Zustand akquirierten Änderungen führten zu schnellerem Wachstum. Jedoch wurde das Regulationspotential hierdurch nicht verändert, da auch nach langer Kultivierung und Zunahme der Teilungsrate ein vollständiger Proliferationsstopp induziert werden konnte. Somit treten im aktivierten Zustand Veränderungen auf, die für sich genommen kein Wachstum bewirken. Vielmehr unterstützen die Mutationen die Proliferation und sorgen somit für eine schnellere Teilungsrate der Zelle. Dies führt im Verlaufe einer längeren Kultivierung zu einer Selektion der Zellen mit den schnellsten Teilungsraten. Allerdings ist dieser Prozess nicht spezifisch für pRITA-Zellen, sondern ein Beispiel für die in der Zellkultur stattfindende Selektion/Evolution.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass pRITA-Zellen, wenn sie in hoher Dichte ausgesät und für längere Zeit kultiviert wurden, vereinzelt Klone (MBa10S-Zellen) bildeten. Diese MBa10S Zellen wiesen kein regulierbares Wachstum mehr auf (Abb.24), was daraufhin deutet, dass im reprimierten Zustand Mutationen entstehen, die für sich genommen Wachstum induzieren können. Das dies nur im reprimierten Zustand auftritt, könnte darin begründet liegen, dass seneszente Zellen vermehrt sekretierte Wachstumsfaktoren bilden. Zwei Studien

zeigten, dass diese Wachstumsfaktoren Proliferation anderer, kokultivierter Zellen wie Fibroblasten und Epithelzellen anregen (Chang et al., 2000; Krtolica et al., 2001).

Darüber hinaus wurden wachstumsinduzierende Mutationen auch durch das mehrmalige Regulieren der TAg-Expression hervorgerufen, was sich in einer geringeren Stringenz des Proliferationsstopps widerspiegelte (Abb. 25 B).

Die Art der Mutationen, die für das beobachtete Wachstumsverhalten verantwortlich sind, wurde nicht näher untersucht. Prinzipiell sind die Ursachen für das Entstehen von derartigen Mutationen vielfältig. Beispielsweise weisen die verschiedenen Mausinzuchtstämme unterschiedlich hohe Mutationsraten auf. Die für die Experimente verwendeten Zelllinien wurden alle aus Balb/c Mäusen gewonnen. Dieser Stamm hat einige Defekte in DNA Reperaturmechanismen (Boerrigter et al., 1995; Okayasu et al., 2000), so dass er eine vergleichbar hohe Mutationsrate aufweist.

Darüber hinaus beeinflussen und verändern die gewöhnlich verwendeten Zellkulturbedingungen die chromosomale Stabilität muriner Zellen. So wurde gezeigt, dass eine Kultivierungsatmosphäre mit 20 % Sauerstoff starke chromosomale Veränderungen hervorruft (Parrinello et al., 2003). Neben der Sauerstoffkonzentration löst auch die Verwendung von Serum-haltigem Medium DNA Schäden in MEF aus. So werden vermutlich durch das Serum eine Vielzahl mitogener Stimuli induziert, welche die Entstehung eines abnormen Karyotyps begünstigen (Woo und Poon, 2004).

Die bisherigen Erklärungen für die beobachteten Mutation gelten generell für alle murine Zellen, da sie durch den sogenannten „Kultivierungsstress“ induziert werden (Sherr und DePinho, 2000). Allerdings gibt es auch Gründe, warum speziell in pRITA-Zellen vermehrt Mutationen auftreten können. Beispielsweise ruft eine permanente TAg-Expression DNA-Schäden hervor, durch die ein aneuploider Chromosomensatz entstehen kann. Dies wurde bereits in murinen aber auch in humanen Zellen beobachtet. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Allerdings wird vermutet, dass die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 eine entscheidende Rolle spielt, da er eine Vielzahl von DNA Reparaturprozessen reguliert. Darüber hinaus scheint aber auch die Interaktion zwischen TAg und Bub1 eine Rolle bei der Veränderung des Chromosomensatzes zu spielen. Bub1 kontrolliert während der Mitose die Bildung der Spindelkomplexe. Durch die Interaktion mit TAg wird dieses Programm stark beeinträchtigt. Eine Studie zeigte, dass dadurch der Anteil der tetraploiden Zellen stark zunahm (Cotsiki et al., 2004).

Auch während der Seneszenz treten verstärkt DNA-Schäden auf, die wahrscheinlich zu einer höheren Mutationsrate in diesem Zustand führen (dAdda di Fagagna et al., 2003).



Welche der hier aufgeführten Ursachen in den pRITA-Zellen für die beobachteten Mutationen verantwortlich ist, kann nicht geklärt werden. Darüber hinaus ist auch nicht klar, ob es sich um Effekte handelt, die speziell in pRITA-Zellen ablaufen oder ob es sich um Prozesse handelt, die generell in jeder murinen Zellkultur beobachtet werden.

### **3.5.2 Reprimierte pRITA-Zellen unterscheiden sich signifikant von primären Zellen**

Mit pRITA wurde ein System geschaffen, welches die strikte Proliferationskontrolle ermöglicht. Darüber hinaus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die durch pRITA induzierten Veränderungen revertierbar sind. Daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, inwieweit sich reprimierte pRITA-Zellen und primäre Zellen ähneln, um beantworten zu können, ob das System Eigenschaften primärer Zellen erhalten kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Genexpressionsanalyse herangezogen, da diese Methode sehr viele Parameter einer Zelle erfasst und außerdem Methoden zur Verfügung stehen, welche die Ähnlichkeit zweier Proben bestimmen.

Über ein hierarchisches Clustering wurde festgestellt, dass reprimierte pRITA- und primäre Zellen sehr große Unterschiede zueinander aufweisen (Abb. 27). Dies kann daran liegen, dass pRITA-Zellen klonalen Ursprungs sind, während sowohl die primären als auch die spontan immortalisierten Zellen ein Gemisch darstellen. In einem Klon wird das Genexpressionsmuster stärker als in einem Gemisch von Zell-spezifischen Merkmalen beeinflusst. Dies ist darin begründet, dass in einem Gemisch die Durchschnittsexpression vieler Zellen gemessen wird und so klonale Variabilitäten gemittelt werden.

Weiterhin ist es schwierig zu definieren, zu welchem Zeitpunkt eine Zelle primär ist, da frisch isolierte („primäre“) Zellen innerhalb von wenigen Passagen ihre Eigenschaften stetig verändern. Anfänglich zeigen zum Beispiel MEF eine hohe Proliferationsrate, hingegen sind sie nach fünf bis sieben Passagen seneszent. Dies wirkt sich vermutlich auch auf das Transkriptom der „primären“ Zellen aus. Für den Vergleich wurden primäre Zellen in der vierten Passage eingesetzt, da Zellen dieser Passage beide Extreme, Proliferation und Seneszenz, aufweisen.

Die direkten Vergleiche zwischen primären und reprimierten pRITA-Zellen zeigten auch, dass eine sehr große Anzahl von Genen (~600) differentiell exprimiert sind (Tabelle 6). Dies lässt vermuten, dass die beiden genannten Gründe nicht ausreichen, um die große Differenz der beiden Zustände zu erklären. Einen weiteren Erklärungsansatz ergibt sich aus dem „Clustering“ mit dem „k-means“ Algorithmus (Abb. 28). Im Vergleich der primären Zellen

mit den autoregulierten Zellen stellte sich heraus, dass der Immortalisierungsprozess als solches die Expression von rund 2 % der 22000 untersuchten Gene beeinflusst. Ein Effekt, der nicht mit der TAg-Expression korreliert, da in an- und abgeschalteten Zellen die Expressionshöhe dieser Gene vergleichbar ist. Somit scheinen diese Gene weder für die Proliferation der Zellen noch für die Induktion der Seneszenz benötigt zu werden. Auch klonale Ursprünge können diese Gengruppe nicht erklären, da hierfür ihre Anzahl zu groß ist. Eine mögliche Erklärung liefert eine Studie von mehreren murinen Brustkrebsmodellen. Die Tumore wurden durch unterschiedliche Onkogene wie TAg, c-Myc oder auch v-Ha-ras hervorgerufen. Dabei zeigte sich, dass durch die verschiedenen Onkogene sehr unterschiedliche Gengruppen differentiell exprimiert wurden. So scheint jedes Onkogen quasi seinen spezifischen „Fingerabdruck“ im Transkriptom der Zelle zu hinterlassen (Desai et al., 2002). Dieses Konzept, dass der auslösende onkogene Stimulus einen entscheidenden Einfluss auf das Transkriptom des Tumors hat, wurde auch in anderen Ansätzen beobachtet. So induzieren die Karzinogene DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthrazen) und PhiP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) in Mäusen zwar histologisch identische Tumore. Allerdings rufen sie sehr unterschiedliche Änderungen im Genexpressionsprofil hervor (Shan et al., 2002). Dass diese These nicht auf Mäuse beschränkt ist, sondern auch in Menschen gelten kann, zeigt eine Studie von Jazaeri und Kollegen (2002) bei der der Einfluss von Keimbahnmutationen von BRCA1 und BRCA2 auf das Genexpressionsprofil untersucht wurde. Daher sollte es auch prinzipiell möglich sein anhand des Transkriptoms zu erkennen, welches Onkogen für die Entstehung des untersuchten Tumors verantwortlich war/ist.

Die rund 400 Gene (Abb. 28), die in pRITA-Zellen unabhängig von der TAg-Expression differentiell exprimiert werden, deuten daraufhin, dass sich in diesen Zellen bereits ein molekularer Fingerabdruck von TAg manifestiert hat. Demnach würden durch die TAg-Expression während der Immortalisierung Prozesse in Gang gesetzt werden, an deren Ende Gene irreversibel in ihrem Expressionsverhalten verändert werden und somit den „TAg-Fingerabdruck“ bilden.

### **3.5.3 Ist eine „weiche Immortalisierung“ möglich?**

Es wäre wünschenswert, Zellen mit Genen zu immortalisieren, die einen definierten, aber wirksamen Effekt auf die Zellzyklusregulation haben („weiche“ Immortalisierung). TAg ist sicherlich kein Kandidat, um eine derartige „weiche“ Immortalisierung zu erzielen. Dies leitet sich aus der Vielfalt der Effekte ab, welche vom TAg beeinflusst werden. Vor allem die durch TAg induzierte genomische Instabilität verhindert, dass Zelllinien, die mit diesem Onkogen etabliert wurden, primären Zellen ähneln.

Daher wären für eine „weiche Immortalisierung“ andere Ansätze wahrscheinlich geeigneter. Kandidaten hierfür sind beispielsweise p16Ink4a oder p19Arf. So zeigte eine Studie, dass MEF durch die Inaktivierung einer der beiden Tumorsuppressoren immortalisiert werden (Carnero et al., 2000). Zudem konnte bei p16 -/- Makrophagen und bei p19 -/- B-Zellen eine Immortalisierung erreicht werden, ohne dass sich der Karyotyp der Zellen veränderte (Randle et al., 2001). Darüber hinaus wiesen die etablierten Zelllinien einige für solche Zellen charakteristische Merkmale auf, wie spezifische Oberflächenmarker oder Phagocytose.

Allerdings hat nicht nur das Onkogen einen erheblichen Einfluss auf die Zellen, sondern auch die Kultivierungsbedingungen. So induzieren sowohl O<sub>2</sub> als auch Serum-haltiges Medium starke chromosomale Veränderungen in murinen Zellen (siehe Kapitel 3.5.1), die allein schon zur Immortalisierung führen können. Daher ist es fraglich, ob eine „weiche“ Immortalisierung vor dem Hintergrund der spontanen Mutationen, welche durch die Kulturbedingungen hervorgerufen werden, möglich ist. Wahrscheinlich kann dies nur mit angepassten Kulturbedingungen erreicht werden. So wurden in der angesprochenen Studie beispielsweise die B-Zellen auf sogenannten „Feeder-Zellen“ kultiviert und für die Makrophagen wurde ein spezielles Medium verwendet (Randle et al., 2001). Dies legt den Schluss nahe, dass für eine „weiche“ Immortalisierung mit pRITA beide Punkte, Onkogen und Kulturbedingungen, angepasst werden müssten.

### **3.6 Ausblick**

#### **3.6.1 Vektorverbesserung**

Wie die Ergebnisse zeigen, erlaubt die transkriptionelle Regulation der Immortalisierung mittels pRITA eine strikte Proliferationskontrolle. Um mit diesem Vektor routinemäßig konditional immortalisierte Zelllinien von Mausmutanten zu etablieren, wären bestimmte Modifikationen sinnvoll.

Die überwiegende Zahl der „knock-out“ Mäuse tragen bereits das Selektionsgen Neomycin. Daher kann nicht auf die stabile Integration von pRITA mit Hilfe von G418 selektiert werden. Da murine Zellen relativ leicht spontan immortalisieren, wäre der Austausch des Selektionsmarkers sinnvoll, um weiter auf Integration des Vektors selektieren zu können.

Eine andere Modifikation von pRITA betrifft das Onkogen. Über den Austausch des Onkogens könnte eine größere Zelltyp-Spezifität erreicht werden. Während TAg nahezu jeden murine Zelltyp immortalisieren kann, immortalisieren manche Onkogene nur bestimmte Zelltypen. Beispiel hierfür sind das Polyoma middle T antigen (Endothelzellen) (Mühlner et al., 1999);  $\Delta$ -Notch (hematopoetische Vorläuferzellen) (Varnum-Finney et al., 2000) und N-

myc (neuronale Zellen) (Villa et al., 2000). Daher könnte es sinnvoll sein TAg gegen spezifischere Onkogene auszutauschen, um so durch die Immortalisierung eine Vorselektion auf den gewünschten Zelltyp zu bekommen. Über den Austausch des Onkogens könnte eventuell auch die in Kapitel 3.5.3 angesprochene „weichere“ Immortalisierung ermöglicht werden.

### 3.6.2 Transduktionsmethode

Damit wäre aber ein anderes Problem der Immortalisierung nicht gelöst: die effiziente Transfektion primärer Zellen. Um eine immortalisierte Zelllinie zu etablieren, muss die DNA in die Zellen gelangen und anschließend in das Genom integrieren. Hierbei muss der Vektor in eine genomische Umgebung integrieren, die eine hohe Transgenexpression erlaubt. Insgesamt ist dieser Prozess sehr ineffizient, wie auch die Transfektion von pRITA in MEF zeigte (ein Klon pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen).

Eine Lösung für dieses Problem wäre die retrovirale Transduktion der autoregulierten Immortalisierungskassette, da mit diesen Viren auch bei primären Zellen erhöhte Infektionseffizienzen zu erwarten sind. Ein weiterer Vorteil eines solchen Virus wäre, dass es sehr effizient in das Wirtsgenom integriert. Die Integration findet dabei vermehrt in genomischen Orten statt, die eine hohe Transkriptionsrate aufweisen (Wu et al., 2003). Dies würde sich wahrscheinlich auch positiv auf die Transgenexpression auswirken.

Allerdings weisen die bisher mit autoregulierten bidirektionalen Kassetten hergestellten Retroviren einige Nachteile auf. Das Hauptproblem war das autoregulierte Viren nur mit einem sehr niedrigen Titer ( $1 \cdot 10^2$  infektiöse Partikel) generiert werden konnten. Ein weiteres Problem war, dass bei Infektion oftmals nur ein Teil der autoregulierten Kassette transduziert wurde. Ein Effekt, der auf Splicing-Prozesse oder Rekombinationsereignisse, die während der Verpackung der viralen RNA ablaufen, zurückgeführt wurde (Unsinger, 2001). Das Problem des Splicings könnte eventuell der Einbau eines Splice Akzeptors vor der autoregulierten Kassette lösen.

Eine Alternative ist die Transduktion der autoregulierten Kassette mittels Lentiviren. Diese Subtypen der Retroviren erweiterten das Spektrum der infizierbaren Zellen deutlich, da Lentiviren auch in das Wirtszellgenom integrieren können, wenn die Zellen sich nicht teilen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass bidirektionale autoregulierte Kassetten in diesem Virenkontext regulierte Transgenexpression ermöglichen (Fussenegger, persönliche Kommunikation).

Bei lentiviralen Vektoren werden häufig Sicherheitsaspekte diskutiert. So wäre es denkbar, dass die lentiviralen Vektoren mit endogenen Sequenzen rekombinieren und dadurch

replikations-kompetente Viren entstehen. Während derartige Rekombinationsereignisse bei den auf klassischen Mausretroviren basierenden Vektoren in Einzelfällen beschrieben wurde, ist dies für lentivirale Vektoren bisher aber nicht bekannt. Der lentivirale Transfer stellt somit die Methode der Wahl dar.

### **3.6.3 Zelllinien aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) oder transgenen**

#### **Mäusen**

Eine weitere Möglichkeit für die Etablierung von Zelllinien ist die Nutzung von ES-Zellen. Der große Vorteil dieser Zellen ist, dass sie sich genetisch modifizieren lassen ohne ihre Omnipotenz zu verlieren. pRITA könnte also stabil in die ES-Zellen integriert werden, wobei anschließend für die Etablierung von Zelllinien mehrere Ansätze denkbar sind.

(1) Die ES-Zellen sind aufgrund ihrer Omnipotenz in der Lage auch *in vitro* in verschiedene Zellarten zu differenzieren. So wurden mit dieser Methode unter anderem neuronale- und, hematopoetische Zellen sowie Endothelzellen generiert (Übersicht in Wobus 2001). Nach einer erfolgten Differenzierung würde pRITA aktiviert werden, wodurch die differenzierten Zellen immortalisiert würden. Ein Nachteil bei diesem Ansatz ist, dass die Differenzierung der ES-Zellen nicht homogen erfolgt, womit ein Gemisch von verschiedenen immortalisierten Zellarten generiert würde. Das Hauptproblem dieses Ansatzes ist aber, dass bisher noch nicht dokumentiert ist, ob die Differenzierung vollständig ist. So ist nicht klar, ob durch die Differenzierung tatsächlich terminal differenzierte Zellen entstehen oder ob die ES-Zellen nur andifferenzieren. Letzteres würde den Nutzen solcher Zelllinien stark reduzieren. (2) Ein anderer Ansatz ist vor allem für ES-Zellen interessant, in denen ein zu untersuchendes Gen ausgeschaltet wurde. Solche ES-Zellen werden gewöhnlich zur Generierung von sogenannten „knock-out“ Mäusen verwendet werden, was ein sehr zeit- und kostenintensiver Prozess ist. Alternativ könnte man pRITA in solche „knock-out“ ES-Zellen stabil integrieren und diese anschließend in die Blastocyste einer scheinschwangeren Maus injizieren. Dadurch entstehen chimäre Embryonen, welche aus wildtyp- und „knock-out/pRITA-“ Zellen bestehen. Durch Aktivierung von pRITA würde man die „knock-out“-Zellen immortalisieren und könnte sie nachfolgend analysieren. Durch diesen Prozess hätte man sehr viel schneller terminal differenzierte „knock-out“ Zellen zur Analyse gewonnen. (3) Eine weitere Möglichkeit, um immortalisierte Zellen zu generieren, wäre die Etablierung von pRITA transgenen Mäusen. Mit diesen könnten immortalisierte Zellen direkt aus dem Gewebe der transgenen Tiere etabliert werden, was den Vorteil hätte, dass auch rare Zellpopulationen immortalisiert werden könnten, da kein Gentransfer eines Onkogens benötigt wird.

### 3.6.4 Aufklärung molekularer Netzwerke mittels der „DNA-Chip“ Analyse

Die Auswertung der „DNA-Chip“ Analyse lieferte eine detaillierte Beschreibung der molekularen Veränderungen der konditional immortalisierten Zelllinien. Auf dieser Basis können weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden. Diese wären dahin gerichtet, die Funktionen von Genen oder deren Zusammenspiel bei Prozessen wie Seneszenz oder Proliferation aufzuklären.

Zunächst könnte die Transkriptomanalyse mit der chromosomalen Lokalisation der differentiell exprimierten Gene gekoppelt werden, wie dies bei einer Studie für seneszente humane Zellen durchgeführt wurde (Zhang et al., 2003). In dieser Studie wurden genomische Loci identifiziert, in denen vermehrt Gene lokalisiert sind, die während der Seneszenz differentiell reguliert sind. Die Expression dieser Gene scheint dabei essentiell für die Seneszenz zu sein. Mit Hilfe einer solchen Analyse in pRITA-Zellen könnten somit genomische Orte und damit Gene identifiziert werden, die während Seneszenz, Proliferation oder Reanimation exprimiert werden müssen. Darüber hinaus könnte die obengenannte Studie genutzt werden, um das Transkriptom der Seneszenz in Mensch und Maus zu vergleichen und Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschiede der beiden Spezies aufzudecken.

Die bisher mit den „DNA-Chips“ untersuchten Proben sind Momentaufnahmen des Transkriptoms. Die Dynamik der Genexpression ist noch nicht in die Analysen mit einbezogen worden. Interessant ist diese Herangehensweise beispielsweise für den Reprimierungsprozess der pRITA-Zellen, da so Gene ermittelt werden, welche Seneszenz induzieren und aufrechterhalten sowie für den Reanimationsprozess, da so für die Anregung des Zellwachstums essentielle Gene detektiert werden.

Außerdem wäre es mit Hilfe solcher Kinetiken möglich, kleinere Regulationsnetzwerke zu identifizieren. So sollte zum Beispiel ein anfänglich exprimierter Transkriptionsfaktor nachfolgend seine Zielgene induzieren, was durch deren differentiellen Expression nachweisbar sein sollte. Über die Kopplung von Transkriptom- und Promoteranalyse kann dieser Ansatz auch zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren genutzt werden, die maßgeblich an einem Prozess beteiligt sind (Aerts et al., 2003; Karanam und Moreno, 2004). Hierzu würden die Promotoren der differentiell exprimierten Gene daraufhin untersucht, ob sie Bindemotive von Transkriptionsfaktoren aufweisen. Wird in den Promotoren der differentiell regulierten Gene ein Bindemotiv eines Transkriptionsfaktors überproportional detektiert, deutet dies daraufhin, dass dieses Protein entscheidend an dem Prozess beteiligt ist. Für Experimente dieser Art wäre beispielweise E2F-1 ein geeigneter Ansatzpunkt, da für

diesen Transkriptionsfaktor bereits viele biologische Informationen bekannt sind, anhand derer die experimentelle Strategie validiert werden kann.

Die Experimente zur Reanimation brachten ein weiteres interessantes Phänomen der reprimierten pRITA-Zellen zu Tage. Die induzierte Seneszenz ist teilweise irreversibel. Ein ähnliches Verhalten wurde für humane Zellen beschrieben, wobei wenig über die beteiligten oder benötigten Gene bekannt ist (Beausejour et al., 2003). Um Einblicke in die molekularen Prozesse dieses Mechanismus zu erhalten, sind die pRITA-Zellen ein geeignetes Modellsystem. Die Seneszenz kann durch Dox Entzug homogen ausgelöst werden und durch erneute Dox-Gabe wird ein Teil der Zellen reanimiert. Die Expression des Reportergens eGFP kann dabei ausgenutzt werden, um mittels FACS-Sortierung die reanimierbaren und irreversibel arretierten Zellen voneinander zu trennen. Mit Hilfe einer „DNA-Chip“ Analyse der beiden Zellpopulationen könnten dann die Unterschiede der beiden Zellpopulationen aufgedeckt werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte

Tischzentrifugen	Eppendorf 5417C Heraeus Biofuge 13 Heraeus Christ Minifuge GL Hettich Rontana/S
Kühlzentrifugen	Sorval Superspeed RC5 Minifuge Heraeus-Christ Biofuge fresco Festwinkelrotoren: GSA, GS3, SS34 Schwingbecherrotor: HB4
Photometer	Hitachi U-1100
Fluoreszenz-Elisa-Reader	Wallace Victor <sup>2</sup> 1420 Multilabel counter Labsystems Multiskan
Gelelektrophoresekammer	BRL Horizon 58 BRL Horizon 1114 BRL Horizon 2025 Owl Separation System, Model: A2
Mikroskop	Leitz Labovert FS Leica DMIL
UV-Kammer	Hanau
Videograph	Biotec Fischer Video Densitometer Mitsubishi Thermodrucker und Personal Computer
Netzgeräte	Desaga Mains Power Supply Unit 1200/200 Biorad Power Pac 300
Durchflusscytometer & Software	FACScan von Becton Dickinson FACSCalibur von Becton Dickinson Macintosh Quadra 650
Luminometer	Berthold Lumat LB 9501
Zellzähler	Schärfe System Casy 1 DT
Zellkultur-Inkubatoren	Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336
Cleanbenches	Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400 Heraeus, HLB 2448 Heraeus, HSP 18 Φ 340, Beckmann
pH-Meter	Biometra T3 Thermocycler
PCR-Maschine	Eppendorf Thermomixer 5436
Thermomixer	Scientific Industries Vortex Genie 2
Vortex	Biorad Gene Pulser und Pulse Controller
Elektroporator	Heidolph
Laborschüttler	Millipore Milli-Q
Wasseraufbereitung	Kodak 20 cm x 30 cm
Exponierkammern	Amersham Hyperfilm-ECL
Filmmaterial	Biorad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell
Elektroblotapparatur	Affymetrix GeneChip fluidic station
Hybridisierungsautomaten	Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer
„DNA-Chip“	Affymetrix MOE430A
verwendete „DNA-Chips“	Nikon Coolpix 4500
CCD-Camera	



## 4.2 Material

Es wurden Chemikalien der Firmen Amersham, Bayer, Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Invitek, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, Stratagene und USB. Die Enzyme lieferten Amersham-Buchler, BRL, Biolabs, Boehringer, Pharmacia, Roche Pharma und USB. Oligonukleotidsynthesen wurden von den Firmen MWG und Eurogentec durchgeführt.

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

Die Texte, Grafiken und Tabellen in dieser Arbeit wurden mit den Programmen Word, Powerpoint, Excel und Access der Firma Microsoft erstellt. Die Auswertung der „DNA-Chip“-Analyse erfolgte mit den frei erhältlichen Programmen Genesis (Sturn et al., 2002), GOSurfer (Zong et al., 2004), MAPPFinder (Doniger et al., 2003) und GenMaPP (Dahlquist et al., 2002) sowie den Affy MAS. Die Bearbeitung von Bilddateien erfolgte mit dem Programm Photoshop 5.0 der Firma Adobe. Zur Entwicklung von Klonierungsschritten, zum Auffinden von PCR-Primern-Sequenzen und zur Restriktionskartierung wurde das Programm Vector NTI 5.0 der Firma ATCC verwendet.

## 4.3 Allgemeine Grundtechniken

### 4.3.1 Sterilisieren durch Hitze

Glasgeräte werden 4 h bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert. Jegliche Materialien aus Plastik wie Eppendorffgefäße und Pipettenspitzen, Lösungen und Holzstäbe werden 25 min bei 121°C autoklaviert.

### 4.3.2 Sterilisieren durch Filtration

Lösungen, die nicht autoklaviert werden können, werden mit Filtern mit einer Porengröße von 2 µm (Sartorius) sterilisiert.

### 4.3.3 Phenolisieren von DNA

*Phenol (Fa. Roth):* redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol (pH 7.8 bis 8.0), 0.1% (w/v) 8-Hydroxychinolin

*TE-Puffer:* 0.1 mM EDTA, 10mM Tris/HCl in H<sub>2</sub>O, pH 8.0

Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA-haltigen Lösung wird diese mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1) im gleichen Verhältnis versetzt und auf dem Vortexer vermischt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (1 min; 13000 rpm). Die obere wässrige Phase wird abgenommen und erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung versetzt, um Phenolreste zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wird die obere Phase abgenommen und kann weiterverarbeitet werden.

### 4.3.4 Fällung von DNA

*LiCl/Ethanol:* 0.6 M LiCl in Ethanol (Lagerung bei -20°C)

Die DNA-haltige Lösung wird mit 2fachem Volumen LiCl/Ethanol-Lösung versetzt und für mindestens 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15 min; 13000 rpm; 4°C) wird die DNA mit 70 %igem Ethanol entsalzt. Anschließend wird die Lösung zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

#### 4.4 DNA-Modifizierung (nach Maniatis et al., 1982)

##### 4.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

DNA wird mittels Restriktionsenzymen gespalten, wobei die vom Hersteller der Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur) verwendet werden. Die Reaktion kann durch Erhitzen (20 min bei 65°C/80°C) oder Phenolisierung abgestoppt werden.

##### 4.4.2 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

*10x Klenow-Puffer:* 50 mM Tris/HCl in H<sub>2</sub>O, pH7.2, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM DTT  
*dNTP-Mix:* je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Es werden maximal 1 µg DNA mit 5'-überstehenden Enden mit 3 µl des dNTP-Mixes und 1 U Klenow-Enzym (Gesamtvolumen 50 µl) bei 25°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen (80°C für 20 min) gestoppt.

##### 4.4.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

*10x Phosphatase-Puffer:* 500 mM Tris/HCl, pH9.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>,  
1 mM Spermidin

Zur Verhinderung der Religation eines gespaltenen Vektors werden die 5- oder 3'-überstehenden Enden mit alkalischer Phosphatase („shrimp alkaline phosphatase“ (SAP)) dephosphoryliert. Dazu werden 20-100 pmol überstehende Enden mit 10x Phosphatase-Puffer und 1-2 U SAP (Gesamtvolumen 50 µl) bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen (20 min 80°C) abgebrochen.

##### 4.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

*5x Ligase-Puffer:* 250 mM Tris/HCl, pH7.6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% (w/v) PEG8000,  
5 mM ATP, 5 mM DTT

In einem 10 µl Ansatz mit 2 µl 5x Ligase-Puffer 1 U T4-DNA-Ligase werden ca. 20 fmol des Vektorrückgrats und ca. 60 fmol des zu inserierenden DNA-Fragmentes bei RT über Nacht inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen.

##### 4.4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Vermehrung bestimmter DNA-Sequenzen. Für dieses Verfahren muss ein Teil der zu amplifizierenden Sequenz bekannt sein, zu der komplementäre Oligonukleotid-Primer hergestellt werden können. Der Amplifikationsprozess besteht aus drei, sich wiederholenden Stufen. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei hoher Temperatur (94-96°C) in zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Anschließend binden bei niedriger Temperatur die Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen (Annealing). Durch eine DNA-Polymerase werden die

Primer verlängert (Primer-Extension). Danach kann der Zyklus von neuem beginnen. Aufgrund der hohen Temperaturen können nur thermostabile DNA-Polymerasen, wie die Taq-Polymerase verwendet werden. Es werden allerdings auch andere Enzyme verwendet, die eine „proof-reading“ Aktivität aufweisen, so dass im Verlauf des Extensionsprozess weniger Fehler auftreten.

#### Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR (Roche Pharma)

*10x PCR-Puffer:* 13-22.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris/HCl, pH9.2, 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

*Polymerase-Mix:* Taq-Polymerase,  
Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* (Korrekturenzym)

*10x dNTP-Mix* jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Es werden 4.5 µl des 10x PCR-Puffers mit 2 µl 10mM dNTP-Mix, 5 µl Primer A (10 pmol/µl), 5 µl Primer B (10 pmol/µl) und 5 µl DNA-Templat (100 pg Plasmid oder 100 ng HMW-DNA) in einem Gesamtvolumen von 45 µl in einem sterilen PCR-Reaktionsgefäß vermischt. Der Ansatz wird in einer PCR-Maschine auf 95°C für 5 min erhitzt. Dann wird der Ansatz bei 68°C für 10 min inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Zugabe der Polymerasen (1U in 1x PCR-Puffer). Anschließend beginnt die PCR in den beschriebenen drei Stufen, hier als Beispiel: Denaturierung bei 95°C für 60 sec, Annealing der Primer bei 40-60°C für 60 sec, Extension bei 68°C. Die Dauer des letzteren Schrittes hängt von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz ab (ca. 1000 bp pro 60 sec). Die Annealing Temperatur wird durch die Primer-Länge (15-30 bp) und den GC-Gehalt (Optimum bei ca. 50%) bestimmt. Der Zyklus wird 25- bis 35-mal wiederholt.

#### **4.4.6 Agarose-Gelelektrophorese**

*TAE-Puffer:* 40 mM Tris/Acetat, pH7.5, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA

*5x Probenpuffer:* 15% Ficoll, 50 mM EDTA, 1x TAE, 0.05% Bromphenolblau,  
0.05% Xylencyanol

Für ein 1%iges Gel wird 1 g Agarose in kochendem 100 ml TAE-Puffer gelöst und mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Nachdem Erstarren der Agarose wird diese in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gesetzt. Die Proben werden mit dem 5x Probenpuffer vermischt und auf das Gel geladen. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wird neben dem Proben ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei ca. 100 V und 30 mA. Anschließend können die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (360 nm) betrachtet werden. Zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten werden diese aus dem Gel geschnitten und unter Zuhilfenahme des „QIAquick“-Kits isoliert.

#### **4.4.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen (QIAquick-Kit, Qiagen)**

Die zu isolierende DNA wird aus dem Agarose-Gel geschnitten. Das Gelstück wird unter Hochsalzbedingungen bei 50°C für 10 min geschmolzen. Die Lösung wird auf eine Silica-Membran gegeben und bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Säulenmatrix, während die Agarose-Salz-Lösung sedimentiert. Nach Waschen der Säule mit einem Ethanol-haltigem Puffer kann die DNA mittels TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min eluiert werden.

## 4.5 Arbeiten mit E.coli

### 4.5.1 Verwendete Bakterienstämme

*XL1-Blue*: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10, (tet<sup>r</sup>)], (Bullock, 1987)

*DH10B*: F', mcrA Δ-(mrr hsdRMS-mcrBC), φ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araΔ139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, λ, rpsL, end A1, nupG (Gibco BRL)

### 4.5.2 Medien

*LB-Medium*: 10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

*Ampicillin*: 50 mg/ml Ampicillin in Ethanol, sterilfiltriert

*Kanamycin*: 100 mg/ml Kanamycin in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

*SOG-Medium*: 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose (MgSO<sub>4</sub> und Glucose werden vor Gebrauch zugesetzt)

### 4.5.3 Herstellung von Agarplatten

Es werden 15 g Agar (Difco) zu 1 l LB-Medium gegeben und aufgekocht. Nach Abkühlen der Agar-Lösung werden für Ampicillin-haltige Agarplatten 1 ml Ampicillin-Lösung (50 mg/ml), für Kanamycin-haltige Platten 0.5 ml Kanamycin-Lösung (100 mg/ml) zur Agar-Lösung gegeben und diese auf Bakterienplatten verteilt.

### 4.5.4 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Die Bakterien werden in 5 bis 10 ml LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C über Nacht vorkultiviert. Am nächsten Tag wird die Bakterienkultur zu 1 l LB-Medium gegeben und abermals unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Kultivierung wird beendet, wenn die Bakteriensuspension einen O.D.-Wert von 0,6 bis 0,8 (exponentielle Wachstumsphase) bei 600 nm erreicht. Anschließend wird die Bakteriensuspension in vorgekühlte Zentrifugenbecher gegeben und die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation bei 3000 rpm (GS3-Rotor) und 4°C pelletiert. Nach Resuspension in kaltem, sterilem Wasser und wiederholter Zentrifugation werden die Bakterien in 20 ml kalter, 10%iger Glycerin-Lösung aufgenommen und 15 min bei 3500 rpm (SS34-Rotor) und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien werden anschließend in 2 bis 3 ml kalter, 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, in Aliquots zu 50 µl in Eppendorf-Gefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Anschließend kann die Kompetenz der Bakterien mit einer Transformation eines Standardplasmids bestimmt werden.

### 4.5.5 Elektrotransformation kompetenter Bakterien

Es werden 50 µl kompetente Bakterien aufgetaut, auf Eis gestellt und mit ca. 1 µl verdünnter DNA-Lösung oder Ligationsansatz versetzt, vermischt und in eine vorgekühlte Transformationsküvette mit 0.2 cm Elektrodenabstand gegeben. Diese wird in der Gene-Pulser-Apparatur einem elektrischen Feld (2.5 kV, 25 µF, 200 Ω) ausgesetzt. Die Impulsdauer

sollte bei 4 bis 5 ms liegen. Sofort nach Transformation werden die Bakterien in 1 ml SOG-Medium aufgenommen und 30 min unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Anschließend werden Aliquots der Bakterienkultur auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C bis zur Klonbildung kultiviert.

#### 4.5.6 Konservierung von Bakterien

Zur kurzfristigen Lagerung werden Bakterien mit einer Impföse auf Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platte bei 37°C über Nacht wird diese bei 4°C aufbewahrt. Für eine langfristige Lagerung werden Bakterien über Nacht in LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wird im Verhältnis 1:1 mit 87%iger Glycerin-Lösung vermischt und in Glasgefäßen bei -20°C oder -70°C aufbewahrt.

#### 4.5.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab

*STET-Puffer:* 80 g/l Sucrose, 0.5% Triton X100, 50 mM EDTA,  
10 mM Tris/HCl (pH 8.0) in H<sub>2</sub>O

*TE-Puffer:* 0.1 mM EDTA, 10mM Tris/HCl in H<sub>2</sub>O, pH 8.0  
0.2

*Lysozym:* 10 mg/ml Lysozym in TE-Puffer

*Ammoniumacetat:* 8 M NH<sub>4</sub>Oac in H<sub>2</sub>O

*TE-RNase:* 10 µg/ml RNase A in TE-Puffer

Es werden 1,5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit den zu untersuchenden Bakterien angeimpft und diese für 12 bis 16 Stunden unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Bakterien werden in Eppendorfgefäßen 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und anschließend in 500 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 50 µl Lysozym-Lösung versetzt. Nach 2 bis 3 minütiger Inkubation bei RT werden die Bakterien 90 s in einen 95°C heißen Thermoblock erhitzt und anschließend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das zähflüssige Pellet wird mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Die klare Lösung wird mit 50 µl Ammoniumacetat-Lösung und 500 µl Isopropanol vermischt und erneut 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird nach kurzem Trocken bei RT in 50 bis 100 µl TE-RNase-Lösung aufgenommen.

#### 4.5.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im präparativen Maßstab

##### (QIAGEN)

*Resuspensionspuffer:* 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

*Lysepuffer:* 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS

*Neutralisierungspuffer:* 3.0 M Kaliumacetat, pH5.5

*Äquilibrationpuffer:* 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0,  
15% (v/v) Isopropanol, 0.15% TritonX100

*Waschpuffer:* 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% (v/v) Isopropanol

*Elutionspuffer:* 1.25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.5, 15% (v/v) Isopropanol

Es werden 200 ml (Midi-Präparation) bzw. 500 ml (Maxi-Präparation) Antibiotika-haltiges LB-Medium mit den Bakterien angeimpft und über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien 10 min bei 6.000 g und 4°C zentrifugiert und in 4 ml bzw. 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wird vorsichtig bei RT mit 4 ml bzw. 10 ml Lysepuffer versetzt. Die Lysierung der Bakterien wird nach 5 min durch Zugabe von 4 ml bzw. 10 ml Neutralisierungspuffer abgebrochen. Nach weiteren 20 min Inkubation auf Eis werden die bakteriellen Bestandteile durch 30 minütige Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C abgetrennt. Der Überstand mit Plasmid-DNA wird über Filter auf eine mit 4 ml bzw. 10 ml Äquilibrationpuffer vorbehandelte Anionenaustauschersäule gegeben, die Plasmid-DNA bei bestimmter Salzkonzentration und pH-Wert binden kann. Zur Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verbindungen wird die Säule zweimal mit 10 ml bzw. 30 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird die gebundene Plasmid-DNA mit 5 ml bzw. 10 ml Elutionspuffer eluiert und in 3.5 ml bzw. 10.5 ml Isopropanol gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g und 4°C wird die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknung wird die Plasmid-DNA in TE oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

## 4.6 Eukaryontische Zellen und allgemeine Arbeitsmethoden

### 4.6.1 Verwendete Zelllinien

<i>Balb/c 3T3</i>	spontan immortalisierte MEF Zelllinie (im Rahmen der Arbeit durch das 3T3 Protokoll erstellt (Todaro und Green, 1963))
<i>tsa 58-3</i>	auf Ψ2 basierende retrovirale Produktionszelllinie, die stabil pZipSVtsa58 (Jat und Sharp, 1989) exprimiert
<i>MEF</i>	primäre embryonale Mausfibroblasten verschiedener Mausstämme (Balb/c, CB20, C3H) und Chargen

*MBa10 und MBa5* pRITA immortalisierte MEF Klone (Balb/c)

### 4.6.2 Grundmedien

<i>DMEM-Grundmedium</i> (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)	13.63 g/l DMEM-Pulver; 3.67 g/l (44mM) NaHCO <sub>3</sub> ; 2.6 g/l (10mM) HEPES; pH 7.2
<i>PBS</i> (Phosphate buffered saline)	8 g/l (140mM) NaCl; 0.2
<i>TE</i>	6 mM EDTA, 0.1-0.2% Trypsin (Gibco) in PBS
<i>100x Pen/Strep</i>	6.06 mg/ml Ampicillin (10000 U/ml), 10 mg/ml Streptomycin (10mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf pH7.4 einstellen (Lagerung bei -20°C)
<i>100x Glutamin</i>	29,23 mg/ml Glutamin (Lagerung bei -20°C)
<i>FCS</i>	JRH Bioscience
<i>G418</i>	100 mg/ml G418 in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert

<i>Doxozyklin</i>	1 mg/ml Doxycyclin in 70% Ethanol, sterilfiltriert (Lagerung bei -20°C)
<i>1000x <math>\beta</math>-Mercapthoethanol</i>	100 mM Mercapthoethanol (7.014 $\mu$ l pro 1 ml H <sub>2</sub> O)

### 4.6.3 Kulturmedien

<i>für tsa58-3 -Zellen:</i>	1x Pen/Strep, 1x Glutamin, 10% (v/v) FCS (aktiv) DMEM-Grundmedium
<i>für MEF; Balb/c 3T3</i>	1x Pen/Strep, 1x Glutamin 1x nichtessentielle Aminosäuren 10% (v/v) FCS, 1x $\beta$ -Mercapthoethanol DMEM-Grundmedium
<i>für pRITA-Zellen (MBa5/10)</i>	1x Pen/Strep, 1x Glutamin 1x nichtessentielle Aminosäuren 10% (v/v) FCS, 1x $\beta$ -Mercaapthoethanol DMEM-Grundmedium 2 $\mu$ g/ml Doxozyklin

### 4.6.4 Kultivierung von Zellen

Die Zellen werden in geeigneten Kulturgefäßen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem nassbegasteten Brutschrank in entsprechendem Medium kultiviert. Je nach Zelldichte wird nach 2 bis 5 Tagen das Medium gewechselt. Spätestens nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen passagiert. Zur Passagierung werden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit TE trypsinisiert. Die Zellsuspension wird mit Zellkultur vermischt und auf andere Kulturgefäße verteilt. Für die Aktivierung von pRITA Zellen wurden die Zellen mit 2  $\mu$ g/ml Dox kultiviert.

### 4.6.5 Langzeitlagerung von Zellen

Exponentiell wachsende Zellen gewaschen, trypsinisiert und pelletiert (1000rpm, 5 min). Das Zellpellet wird in kaltem FCS mit 0.5% DMSO resuspendiert und auf Cryo-Röhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) verteilt. Das Einfrieren erfolgt langsam: 30 min auf Eis, dann 24 h bei -70°C bevor die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das Auftauen der Zellen erfolgt schnell im 37°C-Wasserbad. Zur Entfernung des DMSO werden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (1000rpm, 5 min). Das Zellpellet wird und in Kulturmedium resuspendiert und auf Kulturgefäße verteilt.

### 4.6.6 Gewinnung von embryonalen Mausfibroblasten (MEF)

Für die Gewinnung von MEF werden Embryonen des Entwicklungstags 13,5 verwendet. Die schwangeren Mäuse werden mittels Genickbruch getötet und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Anschließend werden die Embryonen entnommen und in eine mit PBS-gefüllte Petrischale gelegt. Die Petrischale wird unter ein Mikroskop gelegt und die Embryonen mit Hilfe eines Skalpells geköpft und vom restlichen roten blutbildenden Gewebe entledigt. Der Rest des Embryos wird mit Hilfe eines Skalpells in sehr kleine Stücke geschnitten, welche in ein 50 ml Röhrchen gegeben werden und anschließend mit Trypsin inkubiert werden (für 30 min, 37°C). Nachfolgend wird die Zellsuspension zweimal mit Medium resuspendiert und

zentrifugiert (5 min, 1000 rpm). Danach wird das Medium verworfen und die Zellen eines halben Embryos auf eine 10 cm Platte ausgesät.

#### 4.6.7 Transfektion von MEF mittels Calciumphosphat/DNA-Präzipitation

*2xHEBS-Puffer:* 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O, pH 7.1

*CaCl<sub>2</sub>-Lösung:* 2.5 M CaCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O

1\*10<sup>5</sup> Zellen werden pro 9 cm<sup>2</sup> Platte einen Tag vor Transfektion ausgesät. Für die Transfektion wird in einem 5 ml Röhrchen 150µl 2x HEBS-Puffer vorgelegt. In einem zweiten Röhrchen werden 15 µl CaCl<sub>2</sub>, 5-10µg DNA und H<sub>2</sub>O (Σ= 150µl) vermischt. Anschließend wird das DNA-Gemisch unter Vortexen zum HEBS-Puffer getropft. Dies wird für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Präzipitat-Suspension in das Kulturmedium gegeben wird. Nach sechs bis zwölf Stunden wird das Medium der Zellen gewechselt. Im Falle einer stabilen Transfektion werden die Zellen nach zwei Tagen auf eine mittlere Platte transferiert und mit G418-haltigem Selektionsmedium (0,4 mg/ml) kultiviert. Nach 3-4 Wochen entstehen selektierte, immortalisierte Klone, die unter dem Mikroskop gepickt und in eine 96-Loch-Platte überführt werden. Anschließend werden sie expandiert. Für die Etablierung von pRITA Zellen wurde jeweils 2µg/ml Dox zum Selektionsmedium hinzugefügt.

#### 4.6.8 Retrovirale Infektion von MEF

Am Tag der Infektion ist die tsa58-3 Produktionszelllinie, die stabil pZipSVtsa58 exprimiert (Jat und Sharp, 1989) 70-80% konfluent. Der Zellüberstand wird filtriert (0,4 µm Porengröße) und mit Polybren (Endkonzentration 8 µg/ml) versetzt bevor er mit subkonfluenten MEF inkubiert wird (MOI < 0,1). Nach 24 h wird das Medium ausgewechselt und 48 h nach Infektion wird die Selektion und Expansion, wie unter 4.5.7 beschrieben, gestartet.

#### 4.6.9 Spontane Immortalisierung mittels 3T3 Protokoll

Für die Etablierung der Balb/c 3T3 Zelllinie werden frisch isolierte MEF in einer Konzentration von 3\*10<sup>5</sup> Zellen pro 6 cm Zellkulturplatte ausgesät. Diese Zellen werden alle drei Tage passagiert und erneut in der gleichen Dichte ausgesät (Todaro und Green, 1963). Nach 10-12 Passagen durchlaufen ein Großteil der Kultur eine sogenannte Krise aus der die immortalisierten Zellen hervorgehen (15-20 Passagen).

### 4.7 Zellwachstumsexperimente und FACS-Analytik

#### 4.7.1 Wachstumskurven

Für alle Wachstumskurven wurden 1\*10<sup>5</sup> Zellen pro 6 cm Platte ausgesät und unter den angegebenen Bedingungen (32°C, 37°C, 39°C) kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Zellzahl mit dem CASY1 DT Zellzähler (Schaerfe Systems, Reutlingen, Deutschland) bestimmt, wobei für jeden Datenpunkt 3 unabhängige Kulturen gemessen wurden. Um den Gerätefehler zu reduzieren, wurde jede Probe zusätzlich zweimal gemessen. Für die Ermittlung der Proliferation (Abb.8C) wurde die absolute Zellzahl nach viertägiger Kultur durch die absolute Zellzahl zu Beginn des Experiments dividiert.



### 4.7.2 WST-Assay

Der WST-Assay (Roche Diagnostics, Penzberg) erlaubt eine relative Bestimmung des Zellwachstums. Hierbei wird der Umsatz des Tetrazoliumsals WST-1 zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen gemessen. Für die Bestimmung der Proliferation werden  $1 \cdot 10^3$  Zellen in eine  $0,9 \text{ cm}^2$  Platte ausgesät und unter den angegebenen Bedingungen für eine Woche kultiviert, wobei am vierten Tag das Medium erneuert wird. Am siebten Tag werden die Zellen mit WST-haltigem inkubiert. Hierbei wird der Umsatz zu Formazan photometrisch bei  $420 \text{ nm}$  über die Zeit gemessen (Wallace Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel)(siehe Abb.3C). Um die Proliferationsrate der Zellen bei verschiedenen Dox-Konzentrationen zu bestimmen und miteinander zu vergleichen, wird erst die Absorption bei  $420 \text{ nm}$  gegen die Zeit aufgetragen. In dieser Auftragung wird der Anstieg ermittelt, welcher dann gegen die Dox-Konzentration aufgetragen wird (siehe Abb.4).

### 4.7.3 Klonogenizität

Um die Klonogenizität zu ermitteln, wurden  $1 \cdot 10^3$  Zellen pro  $10 \text{ cm}$  Platte ausgesät und unter den entsprechenden Bedingungen kultiviert ( $32^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $39^\circ\text{C}$ ). Sobald eine Koloniebildung sichtbar wurde (2 Wochen bei  $37^\circ\text{C}$  und  $39^\circ\text{C}$  und 3 Wochen bei  $32^\circ\text{C}$ ), wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt, wobei dies für jeweils 3 unabhängigen Kulturen geschah.

### 4.7.4 Weichagartest

Der Weichagartest ist ein anerkanntes *in vitro* Modell um die Tumorigenizität von Zellen zu bestimmen. Hierzu wird zunächst eine  $0,9 \text{ cm}^2$  Platte mit  $50 \mu\text{l}$   $0,6 \%$ igem Agar/DME Gemisch bedeckt. Anschließend werden darüber  $1 \cdot 10^3$  Zellen in  $50 \mu\text{l}$   $0,3 \%$ igem Agar/DME ausgesät. Dox wurde in einer Konzentration von  $6 \mu\text{g/ml}$  zu den Zellen gegeben, wobei jeweils nach 5-6 Tagen eine erneute Mediumzugabe erfolgt. Nach 2 Wochen wurden die Kulturen aller Experimente mit der gleichen Vergrößerung fotografiert (Nikon Coolpix 4500), um die Größe der Kolonien miteinander vergleichen zu können.

### 4.7.5 SA- $\beta$ -Gal Färbung (Dimri et al., 1995)

*Fixierlösung:* 2% Formaldehyd, 0.1% Glutaraldehyd in PBS

*Färbelösung:* 5 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM Na/Citrat pH 6,0, 150 mM NaCl, 1 mg/ml X-Gal (Stlsg. 20mg/ml in Dimethylformamid)

Mit der SA- $\beta$ -Gal Färbung können seneszente Zellen detektiert werden, dabei macht man sich eine endogene  $\beta$ -Galaktosidase zu Nutze, durch die das Substrat X-Gal umgesetzt werden kann. Dieser Stoffumsatz benötigt aber im Gegensatz zum bakteriellen Reporterenzym  $\beta$ -Galaktosidase einen pH-Wert von 6.0. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung für 2 min versetzt. Nach erneutem zweimaligem Waschen der Zellen werden diese mit der Färbelösung über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Am darauffolgenden Tag kann die Blaufärbung fotografisch festgehalten werden.

### 4.7.6 FACS Analyse des eGFP

Um die eGFP Expression zu ermitteln, werden die Zellen mit und ohne Dox für 3 Tage kultiviert. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit TE trypsinisiert, bevor sie mit Propidiumiodid (PI) ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) angefärbt werden. Danach werden die Zellen

mit einem FACSCalibur (Becton Dickinson) analysiert. Hierbei werden sowohl Zelltrümmer („forward scatter<200“) als auch tote Zellen (PI positiv) von der Analyse ausgeschlossen.

#### 4.7.7 FACS Analyse des TAg

Um das TAg mit Hilfe des FACS zu analysieren, müssen die Zellen permeabilisiert werden. Dies ermöglicht, dass erster und zweiter Antikörper in die Zellen gelangen und dort ihre Epitope binden können. Aktivierte pRITA Zellen sind im Gegensatz zu reprimierten eGFP positiv. Deshalb wird ein Färbeprotokoll ohne Fixier- und Waschschr tte benutzt, da dieses die eGFP Fluoreszenz der aktivierten Zellen auf den Hintergrundlevel der reprimierten Zellen reduziert. Somit ist das gemessene Signal ausschließlich dem sekundären FITC-markierten Antikörper zuzuschreiben.

Die Zellen werden für 2 Tage unter den entsprechenden Bedingungen kultiviert bevor sie trypsinisiert und in einer Dichte von  $1 \cdot 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät werden. Am dritten Tag werden die Zellen trypsinisiert, gewaschen mit PBS und pelletiert (1000 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Zellpellet wird in 100  $\mu\text{l}$  0,5% Triton, 0,5 mM EDTA, 1% BSA in PBS pH 7,2 resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der gegen das gerichtete TAg Antikörper (Oncogene Research; Maus IgG; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) im gleichen Puffer hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der FITC-markierte zweite Antikörper (Jackson Immunoresearch Laboratories; Ziege anti Maus IgG; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hinzugefügt und ebenfalls für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden mit einem FACSCalibur (Becton Dickinson) analysiert, wobei Zelltrümmer von der Analyse ausgeschlossen werden.

#### 4.7.8 Zellzyklusanalyse

Die Zellen werden unter den entsprechenden Bedingungen für 2 Tage kultiviert. Anschließend werden sie trypsinisiert und erneut in einer Dichte von  $1 \cdot 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät. Am darauffolgenden Tag werden sie trypsinisiert und mit kalten PBS ( $4^\circ\text{C}$ ) gewaschen. Nachfolgend werden die Zellen mit einem kalten ( $-20^\circ\text{C}$ ) Methanol/PBS Gemisch (4:1) fixiert. Nach der Lyse der Zellen mit 0,1 % Saponin (gelöst in PBS), wird die DNA mit PI (0,02 mg/ml) angefärbt. Zusätzlich im Färbepuffer sind 1 mg/ml RNase S (Sigma) und 0,1% Saponin enthalten. Die Zellen werden nach 30 min mit Hilfe des FACSCalibur (Becton Dickinson) analysiert, wobei Auswertung der Daten mit dem Programm ModFit geschieht.

#### 4.7.9 BrdU-Färbung

Die BrdU Färbung erlaubt den Anteil der replizierenden Zellen zu bestimmen, da dieses Thymidinanalogon nur während der Synthesephase in die DNA eingebaut wird. Zunächst müssen die Zellen, ausgesät in einer Dichte von  $1 \cdot 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ , für einen bestimmten Zeitraum mit BrdU (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert werden. Zur anschließenden Detektion wird das „BrdU Flow Kit“ (BD Biosciences) mit dem vom Hersteller empfohlenen Färbeprotokoll benutzt. Hierbei werden die Zellen trypsinisiert und mit kalten PBS ( $4^\circ\text{C}$ ) gewaschen bevor sie anschließend für 20 min mit dem BD Cytofix/Cytoperm Puffer inkubiert werden. Nach einmaligem Waschen mit BD Perm/Wash Puffer werden die Zellen für 10 min auf Eis mit dem BD Cytoperm Puffer behandelt. Nach einer erneuten Fixierung mit dem BD Cytofix/Cytoperm Puffer (5 min) werden die Zellen für 1 h mit DNase (30  $\mu\text{g}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wird der APC-markierte anti BrdU Antikörper für 20 min zu den Zellen gegeben bevor die Analyse mit dem FACSCalibur (Becton Dickinson) stattfinden kann. Die Kompensierung wurde dabei wie im Handbuch des „BrdU Flow Kit“ beschrieben durchgeführt.

## 4.8 Proteinanalytik

### 4.8.1 Zellextraktpräparation

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und anschließend mit TE trypsinisiert. Anschließend werden die Zellen in PBS aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 4°C, 1000 rpm). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % Triton; 0,5 % Nonidet p-40 (Sigma); 100x Protease Inhibitor Cocktail SetI (Calbiochem) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C) und der Überstand wird auf seinen Proteingehalt hin untersucht.

### 4.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

*Bradford-Lösung:* 0.07 mg/ml Coomassie Brilliantblau G250, 5% (v/v) Ethanol, 8.5% (w/v) Phosphorsäure in H<sub>2</sub>O  
*Protein-Standard:* 3 mg/ml Lysozym in H<sub>2</sub>O (Lagerung bei -20°C)

In einer 96-Loch Platte wird in der ersten Spalte der Leerwert, in der zweiten Spalte der Proteinstandard und in den restlichen 10 Spalten die Proben gemessen. Dafür wird H<sub>2</sub>O in alle Löcher der Platte vorgelegt (1te Reihe 190 µl; Rest 100 µl). Anschließend wird in die oberste Reihe 10 µl der jeweilige Probe hinzugegeben. Danach werden diese Proben 1:2 in die darunter liegenden Reihen verdünnt. Anschließend werden 100 µl Bradford-Lösung hinzugegeben und die Optische Dichte bei 595 nm gemessen (Labsystems Multiskan). Für die Auswertung wird zunächst der Leerwert von allen Proben subtrahiert bevor dann der Proteingehalt der Zellextrakte über den Vergleich mit dem Proteinstandard ermittelt wird.

### 4.8.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Tricin-SDS-PAGE (Schägger und von Jagow, 1987)

*Anodenpuffer* 40 mM Tris/HCl (pH 8,9)  
*Kathodenpuffer* 20 mM Tris/HCl (pH 8,25)  
 20 mM Tricin  
 0,02 % SDS  
*Gelpuffer* 3 M Tris/HCl (pH 8,45)  
 0,3 % SDS

Zwei 10 %ige Trenngele werden folgendermaßen zusammengesetzt:

Acrylamid/Bisacrylamid (20,8:0,32)	14 ml
Glycerin	4 ml
Gelpuffer	10 ml
Wasser	2 ml

Nachdem Mischen werden zur Polymerisation 15 µl TEMED und 150 µl 10 %iges APS zugesetzt. Die Lösung wird zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Sammelgel dazugegossen.

Sammelgel:

Acrylamid/Bisacrylamid (20,8:0,32)	2 ml
Gelpuffer	3 ml
Wasser	7 ml

Zur Polymerisation werden 10 µl TEMED und 100 µl 10 % iges APS zugegeben. Das Gel wird nach dem Auspolymerisieren in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Anodenbeziehungsweise Kathodenpuffer eingefüllt. Die Proben (20-40 µg) werden im Auftragspuffer (Verhältnis 2:1) erhitzt (95°C, 5 min) und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese läuft bei 200 V für 6-8 h.

#### 4.8.4 „Western Blot“ des TAg

Beim „Western Blot“ erfolgt ein Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Zellextrakte (50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % Triton; 0,5 % Nonidet p-40 (Sigma); 100x Protease Inhibitor Cocktail SetI (Calbiochem)) auf eine Nitrocellulosemembran, um sie dort zu immunologisch identifizieren zu können (Towbin et al., 1979)

<i>Blotpuffer</i>	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	15 % Methanol
<i>TBS-T</i>	20 mM Tris/HCL (pH7,4)
	140 mM NaCl
	0,1 % Tween 20

Nach der Elektrophorese wird das Gel zunächst 15-20 min in Blotpuffer geschwenkt. Eine Hybond-ECL-Nitrocellulose-Membran (Amersham) wird mit Wasser befeuchtet und zusammen mit 6 Whatman-3MM.-Filterpapieren in der Größe des Gels 10 min in Blotpuffer äquilibriert. In die Semidry-Elektroblot-Apparatur werden 3 Lagen Whatman-Papier, dann die Nitrocellulosemembran und anschließend das Gel luftblasenfrei aufgeschichtet. Die Oberseite des Gels wird mit 3 Lagen Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgt 30 min bei 10 V.

Für den immunologischen Nachweis von den an der Nitrocellulose-Membran gebundenen Proteinen wird die Membran mit TBS-T mit 10 % FCS über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, entweder Anti-TAg (Oncogene Research, monoklonaler Antikörper aus Maus, Verdünnung 1:300) oder Anti-Aktin (Santa Cruz; monoklonaler Antikörper aus Maus, Verdünnung 1:10000) erfolgt bei Raumtemperatur für 3 h.

Es folgt ein viermaliges Waschen des Blots für 15 min mit TBS-T. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (Anti-Maus IgG, Peroxidase gekoppelt aus Kaninchen, Amersham), der 1:10000 verdünnt wird, erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Erneut wird der Blot 4x15 min mit TBS-T gewaschen.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Membran werden mit Hilfe der Enhanced Chemilumineszenz (ECL, Amersham) nachgewiesen. Hierzu wird 1 Vol Detektionslösung<sup>1</sup> mit 1 Vol Detektionslösung<sup>2</sup> vermischt und anschließend mit der Membran bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wird mit die Membran mit einem Blaulichtsensitiven Autoradiographiefilm für 1-10 min inkubiert.

### 4.9 Genexpressionsanalyse

#### 4.9.1 RNA Isolation

Da das Transkriptom der Zellen von vielen Faktoren beeinflusst wird, wurde versucht die Variabilität in der Kultivierung so gering wie möglich zu halten. So wurden alle Proben mit dem gleichen Medium und Materialien kultiviert. Darüber hinaus wurden die Zellen auch in der gleichen Zelldichte kultiviert. Um eventuelle Einflüsse der Kultivierung auf das

Genexpressionsprofil zu minimieren, setzte sich jede Probe aus 5 unabhängigen Kulturen zusammen. Weiterhin wurde die Gesamt RNA immer mit dem gleichen Protokoll und den gleichen Materialien isoliert. Für die Isolation der RNA wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen verwendet. Nachdem die Zellen trypsinisiert und gewaschen wurden, sind sie für 20 min mit TRIZOL (Invitrogen) inkubiert worden. Danach folgte eine 30 minütige Zentrifugation (13000 rpm, 4°C) bevor die RNA zweimal phenolisiert wurde. Für die Präzipitation der RNA wurde die wässrige Phase wurde mit Isopropanol versetzt. Anschließend wurde die RNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bevor das RNA-Pellet mit H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -70°C bis zur Analyse gelagert wurde.

#### 4.9.2 Synthese der gelabelten RNA

Die Qualität und Integrität der RNA wird mit dem Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Waldbronn, Germany) überprüft. Zunächst wird die Gesamt RNA in cDNA umgeschrieben, wozu 50-100ng RNA benutzt werden. Diese werden einer reversen Transkription unterzogen. 100 pmol des T7-(T)<sub>24</sub> werden zu der RNA gegeben und erhitzt (10 min, 70°C). Anschließend werden 4 µl „First strand“ Puffer, 2 µl 0,1 mM DTT und 1 µl 10 mM dNTPs hinzugefügt und erhitzt (42°C, 2 min) bevor die reverse Transkription durch Zugabe von 1 µl (200U) SSII Reverse Transkriptase (Invitrogen) gestartet wird (42°C, 1 h). Dann werden 91 µl DEPC H<sub>2</sub>O, 30 µl „Second strand“ Puffer, 4 µl (40 U) DNA Polymerase I, 3 µl 10 mM dNTPs, 1 µl (10 U) DNA Ligase und 1 µl (2 U) RNase H hinzugegeben, um doppelsträngige DNA zu generieren (16°C, 2h). Zuletzt werden 2 µl (20 U) T4 DNA Polymerase hinzugegeben und für 10 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wird durch EDTA abgestoppt und die cDNA wird präzipitiert.

Von der cDNA werden 10 µl zusammen 4 µl Hybridisierungspuffer, 4 µl Biotin markierter Ribonukleotide, 4 µl 10xDTT, 2 µl 20x T7 RNA Polymerase, 12 µl H<sub>2</sub>O bei 37°C für 5 h für die in vitro Transkription inkubiert.

#### 4.9.3 Hybridisierung der cRNA mit den „DNA-Chips“

10 µg der Biotin markierten cRNA werden zusammen mit 13 µl Kontrolloligos bakteriellen und eukaryontischen Ursprungs, 2 µl BSA (acetyliert); 100 µl 2x Hybridisierungspuffer (100 mM MES, 1 M [Na<sup>+</sup>], 20 mM EDTA, 0,01 % Tween) und 2 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) für 16 h bei 45°C unter ständigem Schütteln (60 rpm) mit den „DNA-Chip“ (MOE430A) inkubiert. Anschließend werden die „DNA-Chips“ gewaschen (10 Zyklen bei 25°C mit Waschpuffer A; 4 Zyklen bei 50°C mit Waschpuffer B) und mit Phycoerythrin markierten Streptavidin gefärbt (30 min, 25°C). Nachfolgend findet ein letzter Waschrund mit Waschpuffer A bei 25°C (10 Zyklen) statt. Alle Reaktionsschritte von Hybridisierung, Waschen, Färben und Scannen der „DNA-Chips“ wird mit Hilfe der „Affymetrix GeneChip fluidic station“ durchgeführt.

#### 4.9.4 Datenanalyse der „DNA-Chips“

Die Fluoreszenzsignale der „DNA-Chips“ wurden mit Hilfe der Software „Affymetrix Microarray Suite 5.0“ ausgewertet. Um eine Normalisierung aller Experimente zu erreichen wurde die Zielintensität auf 150 gesetzt, ansonsten wurden alle voreingestellten Werte genutzt. „Affymetrix MicroDB 3.0“ und „Affymetrix Data Mining Tool 3.0“ wurden verwandt, um die Daten in ein für das Datenbankprogramm Microsoft Access lesbares Format zu bringen.

Mit Hilfe von Microsoft Access wurden die differentiell regulierten Gene ermittelt. Dabei wurden folgende Abfragekriterien verwendet: (1) ein Gen musste in einem Vergleich wenigstens 2fach hoch- oder runterreguliert sein, (2) das Gen musste mindestens in einem der

beiden Proben ein Fluoreszenzsignal von 200 aufweisen, (3) das Gen musste einen „change p-value“ von 0,01 (hochregulierte Gene) beziehungsweise 0,99 (herunterregulierte Gene) aufweisen.

#### 4.9.5 “Gene Ontology” Analyse

Für die „Gene Ontology“-Analyse wurde das freierhältliche Programm GOSurfer (Zhong et al., 2004) verwendet. Dieses nutzt die Annotationen, welche von der Firma Affymetrix für ihre „DNA-Chips“ bereitgestellt werden. Um eine Liste von Genen zu analysieren, muss davon nur ein .txt-Datei generiert und in GOSurfer importiert werden.

Die zwischen reprimierten und aktivierten pRITA Zellen differentiell exprimierten Gene (Kapitel 2.4.1 Tabelle 3) wurden einer solchen Analyse unterzogen. Dazu wurden jeweils die hochregulierten (271) und die runterregulierten (216) Gene gruppiert. Anschließend wurden diese beiden Gruppen mit Hilfe von GOSurfer miteinander verglichen. Hierbei werden die „Gene Ontology“-Kategorien angezeigt, mit denen in einem der beiden Gruppen mehr Gene assoziiert sind. Um die Signifikanz dieser Assoziation statistisch abzusichern, wurde mittels des Programms GOSurfer ein  $\chi^2$ -Test ( $p < 0,05$ ) durchgeführt.

#### 4.9.6 “Clusteranalyse”

Mittels einer “Clusteranalyse” können Gene und/oder Proben aufgrund ihrer Ähnlichkeit im Genexpressionsmuster gruppiert werden. Hierfür wurde das frei erhältliche Programm Genesis (Sturn et al., 2002) verwendet. In dieses Programm wurden die Fluoreszenzsignale der „DNA-Chip“-Analyse importiert.

Diese Signale wurden anschließend nach folgender Gleichung normalisiert:

$$\text{normalisierter Wert} = (F_i - mF_i) / \text{Stabwn } F_i$$

$F_i$ :	Genexpression einer Probe (Fluoreszenzsignal)
$mF_i$ :	mittlere Expression eines Gens in allen analysierten Proben
Stabwn $F_i$ :	Standardabweichung für ein Gen innerhalb aller analysierten Proben

Nachfolgend wurde als mathematisches Maß für die Ähnlichkeit die euklidische Distanz gewählt, bevor die „Clusteranalyse“ begonnen wurde. Für die Ermittlung ähnlich exprimierter Gene wurde der „k-means“-Algorithmus verwendet. Dieser teilt die Gene basierend auf ihrem Expressionsmuster in isolierte Gruppen ein, deren Anzahl vor der Analyse bestimmt wird. Zu Beginn werden die Gene wahllos in die Gruppen verteilt und die mittlere Expressionshöhe der Gruppen bestimmt. Als nächster Schritt werden die Gene so verteilt, dass sie in den Cluster kommen, der ihrem Expressionsprofil am nächsten ist. Nachfolgend wird wieder die mittlere Expressionshöhe bestimmt. Dies geht solange weiter bis alle Gene optimal in ihre Gruppen passen. Für die „Clusteranalyse“ bei der die Ähnlichkeit der Proben ermittelt werden sollte, wurde ein hierarchisches „Clustern“ durchgeführt. Dieser Algorithmus beginnt mit einem Gen/Probe. Nachfolgend wird das Gen oder die Probe ermittelt, welche die größte Ähnlichkeit zum ersten aufweist. Dieser Prozess geht solange weiter bis alle Gene in einer Beziehung zueinander stehen (Unterschied zum „k-means“-Algorithmus), die auch als Baumstruktur dargestellt werden kann.

#### 4.9.7 Analyse der Varianz „ANOVA“

Bei ANOVA handelt es sich um ein statistisches Verfahren bei dem Variationen in der Genexpression ermittelt werden, um differentiell exprimierte Gene zu detektieren. Dabei werden sowohl Variationen innerhalb eines Zustandes als auch zwischen den Zuständen

untersucht. Über das Bestimmen der erlaubten Varianz werden dann differentiell exprimierte Gene detektiert. Voraussetzung dafür ist, dass die zu untersuchenden Zustände wenigstens als Duplikate vorliegen.

Für die ANOVA-Analyse werden die Fluoreszenzsignale aller Gene in Genesis importiert und dann mit Hilfe des Programms normalisiert. Anschließend kann sowohl die gewünschte Gruppeneinteilung als auch die Bestimmung des Varianzmaß erfolgen.

## 5 Vektoren und Oligonukleotide

### 5.1 Vektoren

#### 5.1.1 Verwendete Vektoren

pUHRT62-1 (2209)	Urlinger et al., 2000
pLucTE (2367)	Wodarzyck (2004), GBF-Braunschweig
pEMCVHYG (2002)	Verhoeyen et al., 2001
pSA- $\beta$ Geo (2180)	Soriano, 1999
pLAGNP (1672)	Klibisch, GBF-Braunschweig
pBTMRS (1624)	Kröger, GBF-Braunschweig
pLT (2283)	Halter, Roman, Fraunhofer Institut Hannover
pCR-Blunt	Firma Invitrogen
pLucTN (2368)	Wodarczyck, GBF-Braunschweig

#### 5.1.2 Hergestellte Vektoren

pRITA (2287)	auch (pLTRGFPNTN); Das TAG wurde aus pLTLTKN mit <i>EcoRI/PacI</i> herausgeschnitten und mit pMRRGFPNTN, welches auch <i>EcoRI/PacI</i> geschnitten wurde, ligiert.  (SV40-PolyA)-(FRTM5)-(Neo/eGFP)-(EMCV-IRES)-(rtTA2 <sup>S</sup> -M2)-(P <sub>biTA</sub> )-(TAG)-(FRTM5)-(FRTWT)-(SV40-PolyA)
pLTLTKN (2286)	Das TAG wurde aus pLTFRT mit <i>StuI/BamHI</i> herausgeschnitten und mit pMRLTKN, ebenfalls <i>StuI/BamHI</i> geschnitten, ligiert.  (SV40-PolyA)-(FRTM5)-(NeoTk)-(EMCV-IRES)-(wtLuc)-(P <sub>biTA</sub> )-(TAG)-(FRTM5)-(FRTWT)-(SV40-PolyA)
pMRRGFPNTN (2281)	Der reverse Transaktivator rtTA2 <sup>S</sup> -M2 zusammen mit EMCV-IRES und dem Fusionsprotein bestehend aus eGFP und Neo wurden aus pZeroRTA2 mit <i>SpeI/PmeI</i> herausgeschnitten und mit pMRLTKN, welches mit <i>SpeI/SnaBI</i> geschnitten wurde, ligiert.  (SV40-PolyA)-(FRTM5)-(Neo/eGFP)-(EMCV-IRES)-(rtTA2 <sup>S</sup> -M2)-(P <sub>biTA</sub> )-(c-myc)-(Polio-IRES)-(h-rasG12V)-(TAG)-(FRTM5)-(FRTWT)-(SV40-PolyA)



- pLTFRT (2285) Das TAG wurde aus pZeroLT mit *EcoRI/BamHI* herausgeschnitten und mit pBTMRNOT, ebenfalls mit *EcoRI/BamHI* geschnitten, ligiert.  
(P<sub>biTA</sub>)-(TAG)-(FRTM5)-(FRTWT)-(SV40-PolyA)
- pMRLTKN (2212) Das Fragment bestehend aus dem Fusionsprotein Tk und Neo wurde über PCR mit den Primern EMCV-TK5 (P839) und AATSVPA (P1381) und dem Plasmid pLucTE (2367) als Vorlage amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit AatII geschnitten und mit pMRLT, ebenfalls mit AatII geschnitten und dephosphoryliert, ligiert.  
(SV40-PolyA)-(FRTM5)-(NeoTk)-(EMCV-IRES)-(wtLuc)-(P<sub>biTA</sub>)-(c-myc)-(Polio-IRES)-(h-rasG12V)-(TAG)-(FRTM5)-(FRTWT)-(SV40-PolyA)
- pZeroRTA2 (2280) Das Fragment bestehend aus dem Fusionsprotein eGFP und Neo wurde über PCR mit den Primern GFPNECORV (P1392) und FRTNEOGFP (P1393) und dem Plasmid pLAGNP als Vorlage amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde EcoRV/PmeI geschnitten und mit pRTA2EMCVHYG (2277), welches mit EcoRV geschnitten wurde, ligiert. Über dieses Zwischenprodukt wurde eine weitere PCR mit den Primern RTA2NHE (P1394) und FRTNEOGFP (P1393) gefahren, dessen Fragment mit pCR-Blunt ligiert wurde.  
(rtTA2<sup>S</sup>-M2)-(EMCV-IRES)-(eGFP/Neo)
- pRTA2EMCVHYG (2277) Ein Fragment bestehend aus reversem Transaktivator zusammen mit dem EMCV-IRES wurde über PCR mit den Primern RTTA2CLA (P1375) und EMCV-TK3 (P838) und dem Plasmid pRTA2EMCV als Vorlage amplifiziert. Dieses Fragment wurde PflMI/ClaI geschnitten und mit pTAEMCVHYG (2213), ebenfalls PflMI/ClaI geschnitten, ligiert.  
(Splice Akzeptor)-(rtTA2<sup>S</sup>-M2)-(EMCV-IRES)-(Hyg)-(bgh-PolyA)
- pRTA2EMCV (2276) Das EMCV-IRES wurde mit BamHI/NarI aus pLucTE herausgeschnitten und mit pUHRT62-1, ebenfalls BamHI/NarI geschnitten, ligiert.  
(hCMV-Pro)(rtTA2<sup>S</sup>-M2)-(EMCV-IRES)
- pTAEMCVHYG (2213) Das Fragment bestehend aus EMCV-IRES und Hyg wurde über PCR mit den Primern HYGSAC (P1011) und T7PR (P98) und dem Plasmid pEMCVHYG als Vorlage amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde HindIII/SacI geschnitten und mit zwei Fragmenten des Plasmids pSA-β-Geo, die XmnI/SacI und HindIII geschnitten wurden, ligiert. Dies ergab ein Klonierungszwischenprodukt. Ein Fragment bestehend aus dem Transaktivator wurde über PCR mit den Primern TTACLA (P1012) und EMCVTK-3 (P838) und dem Plasmid pLucTE als Vorlage amplifiziert. Das Fragment wurde ClaI/HindIII geschnitten und mit dem

Zwischenprodukt, das auch ClaI/HindIII geschnitten wurde, ligiert. Dies ergab das zweite Zwischenprodukt. Das EMCV-IRES wurde komplettiert durch ein NsiI/PflMI Verdau des Plasmids pLucTE, welcher mit dem Zwischenprodukt 2, das auch NsiI/PflMI geschnitten wurde, ligiert wurde.

(Splice Akzeptor)-(tTA)-(EMCV-IRES)-(Hyg)-(bgh-PolyA)

pZeroLT (2284) Ein Fragment bestehend aus TAg wurde über PCR mit den Primern LTECORI (P1384) und LTBAMHI (P1385) und dem Plasmid pLT als Vorlage amplifiziert. Das Fragment wurde mit dem pCR-Blunt Vektor ligiert.

(TAg)

pBTMRNOT (2207) Die FRT-Stellen wurden über die Primer (komplementär) FRTM5TSSWA (P1377) und FRTANTISENSE (P1378) generiert und mit dem pBTMRS, NotI geschnitten, ligiert.

(P<sub>biTA</sub>)-(c-myc)-(Polio-IRES)-(h-rasG12V)-(FRTM5)-(FRTWT)-(SV40-PolyA)

pMRLT (2211) Das EMCV-IRES und Tk wurden aus pLucTE mit BamHI/AatII herausgeschnitten und mit pOLLUZ (2210), welcher BglII/AatII geschnitten wurde, ligiert.

(Tk)-(EMCV-IRES)-(wtLuc)-(P<sub>biTA</sub>)-(c-myc)-(Polio-IRES)-(h-rasG12V)-(TAg)-(FRTM5)-(FRTWT)-(SV40-PolyA)

pOLLUZ (2210) Das Luziferasegen wurde aus pLucTN über StuI/AatII herausgeschnitten und mit pBTMRNOT, ebenfalls AatII/StuI geschnitten, ligiert.

(wtLuc)-(P<sub>biTA</sub>)-(c-myc)-(Polio-IRES)-(h-rasG12V)-(TAg)-(FRTM5)-(FRTWT)-(SV40-PolyA)

## 5.2 Primer/Oligomere

AATSVPA (P1381)	5'-GGACCTGAATTAAGACGTCAATATTGCATGTGTCAGAGGTTTTACACC-3'
GFPNECORV (P1392)	5'-TTCGGAAGGATGATATCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3'
FRTNeoGFP (P1393)	5'-CCAATTGGAAACATGTGTTTAAACGAAGTTCCTATACCTTTTGAAGAATAGGAAGTTCGGAATAGGAAGTTCGTACGGCCCGGGTCAGAAGAACTCG-3'
RTA2NHE (1394)	5'-GGTTAACCGCTAGCCATGTCTAGACTGGACAAGAGC-3'
RTTA2CLA (P1375)	5'-GCGGAATGACCGAAATCGATCCATGTCTAGACTGGACAAGAGC-3'
EMCV-TK5 (P839)	5'-CCCCGGGGCTCGAGTTTAAACGCGGCCGCGAAATTAATACG-3'
EMCV-TK3 (P838)	5'-GGGGCCCCCAGACGCGTGTGATGGCCGGGGTACGAAGCCATGGTATCATCGTGTTTTTCAAAGG-3'

---

T7PR (P98)	5'- TAATACGACTCACTATAGG-3'
LTECORI (P1384)	5'- GCGCGTACCGAATTCGATATCATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGG-3'
LTBAMHI (P1385)	5'-CGGATCGCTGGATCCTTATGTTTCAGGTTTCAGG-3'
FRTM5STSSWA (P1377)	5'-GGCCATTTAAATGAAGTTCCTATACCTTTTGAAGAATAGGAACTTCGGAA TAGGAACTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATA GGAAGTTC-3'
FRTANTISENSE (P1378)	5'-GGCCGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACT TCGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTCAAAAAGGTATAGGAACTTC ATTAAAT-3'
HYGSAC (P1011)	5'-GGAACCTCGAGCTCTTAGACTTCTACACAGCCATCGGTCC -3'
TTACLA (P1012)	5'-GGAACAATTATCGATAATGTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAG-3'

## 6 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Translationsstart
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ geo	Fusion aus $\beta$ -Galactosidase und Neomycinphosphotransferase
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cdk	Cyclin dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
CMV	Cytomegalovirus
Cre	cyclization recombination (Cre-Rekombinase)
CTP	Cytidintriphosphat
DME	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
eGFP/Neo	Fusionsprotein aus eGFP und Neo
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
Flp	Flp-Rekombinase
FRT	Flp recognition target (Erkennungssequenz der Flp-Rekombinase)
G	Guanin
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
Gal	$\beta$ -Galactosidase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HSV	herpes simplex virus
Hyg	Hygromycin-B-Phosphotransferase
HygTk	Fusion aus Hyg und Tk
IRES	internal ribosomal entry site
Kap.	Kapitel
kb	1000 Basen
kbp	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
kV	1000 Volt
l	Liter
LacZ	$\beta$ -Galactosidase
loxP	Locus of X-over (Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase)
LTR	long terminal repeat

---

MEF	mouse embryo fibroblast (embryonale Mausfibroblasten)
min	Minute
mRNA	messenger RNA
Neo	Neomycinphosphotransferase
nls	nuclear localisation signal (Kernlokalisierungssignal)
O.D.	optische Dichte
ori	origin of replication
pA	polyA
P <sub>bi</sub>	Tetracyclin-abhängiger, bidirektionaler Promotor
PBS	phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Polio	Poliovirus
p53	Tumorsuppressorprotein 53
pRB	Retinoblastomprotein
pRITA	<u>R</u> eversible <u>I</u> mmortalisierung mittels <u>T</u> Ag
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rtTA	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
rtTA2 <sup>s</sup> -M2	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAg	SV40 Large Tumor Antigen
tsTAg	temperatur-sensitive Mutante des TAg
Tet	Tetracyclin
tetO	Operatorsequenz des Tetracyclin-Resistenzsystems
TetOff	Tetracyclin-abhängiges Expressionssystem
TetOn	Tetracyclin-abhängiges Expressionssystem
TetR	Tetracyclin Repressordomäne
Tk	Thymidinkinase
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
Vgl	vergleiche
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)

## 7 Literaturverzeichnis

- Aerts,S., Thijs,G., Coessens,B., Staes,M., Moreau,Y., De Moor,B. (2003). Toucan: deciphering the cis-regulatory logic of coregulated genes. *Nucleic Acids Res.* 31, 1753-1764.
- Akagi,K., Kanai,M., Saya,H., Kozu,T., Berns,A. (2001). A novel tetracycline-dependent transactivator with E2F4 transcriptional activation domain. *Nucleic Acids Res.* 29, E23.
- Ali,S.H., DeCaprio,J.A. (2001). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin.Cancer Biol.* 11, 15-23.
- Alizadeh,A.A., Eisen,M.B., Davis,R.E., Ma,C., Lossos,I.S., Rosenwald,A., Boldrick,J.C., Sabet,H., Tran,T., Yu,X., Powell,J.I., Yang,L., Marti,G.E., Moore,T., Hudson,J., Jr., Lu,L., Lewis,D.B., Tibshirani,R., Sherlock,G., Chan,W.C., Greiner,T.C., Weisenburger,D.D., Armitage,J.O., Warnke,R., Levy,R., Wilson,W., Grever,M.R., Byrd,J.C., Botstein,D., Brown,P.O., Staudt,L.M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.
- Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A., Botstein,D., Butler,H., Cherry,J.M., Davis,A.P., Dolinski,K., Dwight,S.S., Eppig,J.T., Harris,M.A., Hill,D.P., Issel-Tarver,L., Kasarskis,A., Lewis,S., Matese,J.C., Richardson,J.E., Ringwald,M., Rubin,G.M., Sherlock,G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat.Genet.* 25, 25-29.
- Bagchi,S., Weinmann,R., Raychaudhuri,P. (1991). The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 65, 1063-1072.
- Baron,U., Freundlieb,S., Gossen,M., Bujard,H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res.* 23, 3605-3606.
- Beachy,T.M., Cole,S.L., Cavender,J.F., Tevethia,M.J. (2002). Regions and activities of simian virus 40 T antigen that cooperate with an activated ras oncogene in transforming primary rat embryo fibroblasts. *J.Virol.* 76, 3145-3157.
- Beausejour,C.M., Krtolica,A., Galimi,F., Narita,M., Lowe,S.W., Yaswen,P., Campisi,J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22, 4212-4222.
- Berghella,L., De Angelis,L., Coletta,M., Berarducci,B., Sonnino,C., Salvatori,G., Anthonissen,C., Cooper,R., Butler-Browne,G.S., Mouly,V., Ferrari,G., Mavilio,F., Cossu,G. (1999). Reversible immortalization of human myogenic cells by site-specific excision of a retrovirally transferred oncogene. *Hum.Gene Ther.* 10, 1607-1617.
- Bodnar,A.G., Ouellette,M., Frolkis,M., Holt,S.E., Chiu,C.P., Morin,G.B., Harley,C.B., Shay,J.W., Lichtsteiner,S., Wright,W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Boerrigter,M.E., Wei,J.Y., Vijg,J. (1995). Induction and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in C57BL/6 and BALB/c mice: association with aging and longevity. *Mech.Ageing Dev.* 82, 31-50.
- Boshart,M., Weber,F., Jahn,G., Dorsch-Hasler,K., Fleckenstein,B., Schaffner,W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41, 521-530.
- Breggeregere,F., Soroka,Y., Bismuth,J., Friguet,B., Milner,Y. (2003). Cellular senescence in human keratinocytes: unchanged proteolytic capacity and increased protein load. *Exp.Gerontol.* 38, 619-629.
- Bremner,R., Cohen,B.L., Sopta,M., Hamel,P.A., Ingles,C.J., Gallie,B.L., Phillips,R.A. (1995). Direct transcriptional repression by pRB and its reversal by specific cyclins. *Mol.Cell Biol.* 15, 3256-3265.
- Cai,J., Ito,M., Westerman,K.A., Kobayashi,N., Leboulch,P., Fox,I.J. (2000). Construction of a non-tumorigenic rat hepatocyte cell line for transplantation: reversal of hepatocyte immortalization by site-specific excision of the SV40 T antigen. *J.Hepatol.* 33, 701-708.

- Carnero,A., Hudson,J.D., Price,C.M., Beach,D.H. (2000). p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat.Cell Biol.* 2, 148-155.
- Cavender,J.F., Conn,A., Epler,M., Lacko,H., Tevethia,M.J. (1995). Simian virus 40 large T antigen contains two independent activities that cooperate with a ras oncogene to transform rat embryo fibroblasts. *J.Virol.* 69, 923-934.
- Chang,B.D., Swift,M.E., Shen,M., Fang,J., Broude,E.V., Roninson,I.B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 389-394.
- Chang,B.D., Watanabe,K., Broude,E.V., Fang,J., Poole,J.C., Kalinichenko,T.V., Roninson,I.B. (2000). Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4291-4296.
- Chen,P.L., Scully,P., Shew,J.Y., Wang,J.Y., Lee,W.H. (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58, 1193-1198.
- Chin,L., Tam,A., Pomerantz,J., Wong,M., Holash,J., Bardeesy,N., Shen,Q., O'Hagan,R., Pantginis,J., Zhou,H., Horner,J.W., Cordon-Cardo,C., Yancopoulos,G.D., DePinho,R.A. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468-472.
- Classon,M., Harlow,E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2, 910-917.
- Coller,H.A., Grandori,C., Tamayo,P., Colbert,T., Lander,E.S., Eisenman,R.N., Golub,T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 3260-3265.
- Cotsiki,M., Lock,R.L., Cheng,Y., Williams,G.L., Zhao,J., Perera,D., Freire,R., Entwistle,A., Golemis,E.A., Roberts,T.M., Jat,P.S., Gjoerup,O.V. (2004). Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 947-952.
- Cui,X., Churchill,G.A. (2003). Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol.* 4, 210.
- d'Adda,d.F., Reaper,P.M., Clay-Farrace,L., Fiegler,H., Carr,P., von Zglinicki,T., Saretzki,G., Carter,N.P., Jackson,S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- Dahlquist,K.D., Salomonis,N., Vranizan,K., Lawlor,S.C., Conklin,B.R. (2002). GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nat.Genet.* 31, 19-20.
- Desai,K.V., Xiao,N., Wang,W., Gangi,L., Greene,J., Powell,J.I., Dickson,R., Furth,P., Hunter,K., Kucherlapati,R., Simon,R., Liu,E.T., Green,J.E. (2002). Initiating oncogenic event determines gene-expression patterns of human breast cancer models. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 6967-6972.
- Dimri,G.P., Lee,X., Basile,G., Acosta,M., Scott,G., Roskelley,C., Medrano,E.E., Linskens,M., Rubelj,I., Pereira-Smith,O., . (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 9363-9367.
- Dirac,A.M., Bernards,R. (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J.Biol.Chem.* 278, 11731-11734.
- Doniger,S.W., Salomonis,N., Dahlquist,K.D., Vranizan,K., Lawlor,S.C., Conklin,B.R. (2003). MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biol.* 4, R7.
- Drayton,S., Peters,G. (2002). Immortalisation and transformation revisited. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 12, 98-104.

- Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O., Botstein,D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 14863-14868.
- Ewald,D., Li,M., Efrat,S., Auer,G., Wall,R.J., Furth,P.A., Hennighausen,L. (1996). Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science* 273, 1384-1386.
- Fang,S., Jensen,J.P., Ludwig,R.L., Vousden,K.H., Weissman,A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J.Biol.Chem.* 275, 8945-8951.
- Felsher,D.W., Bishop,J.M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol.Cell* 4, 199-207.
- Flemington,E.K., Speck,S.H., Kaelin,W.G., Jr. (1993). E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 6914-6918.
- Gil,J., Bernard,D., Martinez,D., Beach,D. (2004). Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat.Cell Biol.* 6, 67-72.
- Goodrich,J.A., Hoey,T., Thut,C.J., Admon,A., Tjian,R. (1993). Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* 75, 519-530.
- Gossen,M., Bujard,H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 5547-5551.
- Gossen,M., Freundlieb,S., Bender,G., Muller,G., Hillen,W., Bujard,H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Harbour,J.W., Dean,D.C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2393-2409.
- Harley,C.B., Futcher,A.B., Greider,C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harper,J.W., Adami,G.R., Wei,N., Keyomarsi,K., Elledge,S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Harvey,D.M., Levine,A.J. (1991). p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* 5, 2375-2385.
- HAYFLICK,L., MOORHEAD,P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp.Cell Res.* 25, 585-621.
- Hillen,W., Berens,C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu.Rev.Microbiol.* 48, 345-369.
- Hinds,P.W., Mitnacht,S., Dulic,V., Arnold,A., Reed,S.I., Weinberg,R.A. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70, 993-1006.
- Hu,Q.J., Dyson,N., Harlow,E. (1990). The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J.* 9, 1147-1155.
- Huettner,C.S., Zhang,P., Van Etten,R.A., Tenen,D.G. (2000). Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat.Genet.* 24, 57-60.
- Ikram,Z., Norton,T., Jat,P.S. (1994). The biological clock that measures the mitotic life-span of mouse embryo fibroblasts continues to function in the presence of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 6448-6452.
- Ingles,C.J., Shales,M., Cress,W.D., Triezenberg,S.J., Greenblatt,J. (1991). Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. *Nature* 351, 588-590.



- Jat,P.S., Noble,M.D., Ataliotis,P., Tanaka,Y., Yannoutsos,N., Larsen,L., Kioussis,D. (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 5096-5100.
- Jat,P.S., Sharp,P.A. (1986). Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J.Virol.* 59, 746-750.
- Jat,P.S., Sharp,P.A. (1989). Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol.Cell Biol.* 9, 1672-1681.
- Jazaeri,A.A., Yee,C.J., Sotiriou,C., Brantley,K.R., Boyd,J., Liu,E.T. (2002). Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J.Natl.Cancer Inst.* 94, 990-1000.
- Johnson,D.G., Schwarz,J.K., Cress,W.D., Nevins,J.R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365, 349-352.
- Kaelin,W.G., Jr., Ewen,M.E., Livingston,D.M. (1990). Definition of the minimal simian virus 40 large T ant. *Mol.Cell Biol.* 10, 3761-3769.
- Kamijo,T., Zindy,F., Roussel,M.F., Quelle,D.E., Downing,J.R., Ashmun,R.A., Grosveld,G., Sherr,C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659.
- Karanam,S., Moreno,C.S. (2004). CONFAC: automated application of comparative genomic promoter analysis to DNA microarray datasets. *Nucleic Acids Res.* 32, W475-W484.
- Kastan,M.B., Onyekwere,O., Sidransky,D., Vogelstein,B., Craig,R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.
- Kaufmann,H., Mazur,X., Marone,R., Bailey,J.E., Fussenegger,M. (2001). Comparative analysis of two controlled proliferation strategies regarding product quality, influence on tetracycline-regulated gene expression, and productivity. *Biotechnol.Bioeng.* 72, 592-602.
- Kerr,M.K., Martin,M., Churchill,G.A. (2000). Analysis of variance for gene expression microarray data. *J.Comput.Biol.* 7, 819-837.
- Krimpenfort,P., Quon,K.C., Mooi,W.J., Loonstra,A., Berns,A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413, 83-86.
- Krtolica,A., Parrinello,S., Lockett,S., Desprez,P.Y., Campisi,J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 12072-12077.
- Kussie,P.H., Gorina,S., Marechal,V., Elenbaas,B., Moreau,J., Levine,A.J., Pavletich,N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274, 948-953.
- Lakso,M., Sauer,B., Mosinger,B., Jr., Lee,E.J., Manning,R.W., Yu,S.H., Mulder,K.L., Westphal,H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 6232-6236.
- Land,H., Parada,L.F., Weinberg,R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- Larsson,O., Scheele,C., Liang,Z., Moll,J., Karlsson,C., Wahlestedt,C. (2004). Kinetics of senescence-associated changes of gene expression in an epithelial, temperature-sensitive SV40 large T antigen model. *Cancer Res.* 64, 482-489.
- Lee,M.L., Kuo,F.C., Whitmore,G.A., Sklar,J. (2000). Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 9834-9839.
- Levine,A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

- Lin, Y.S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D., Green, M.R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* 353, 569-571.
- Ludlow, J.W., DeCaprio, J.A., Huang, C.M., Lee, W.H., Paucha, E., Livingston, D.M. (1989). SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 56, 57-65.
- Luo, R.X., Postigo, A.A., Dean, D.C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92, 463-473.
- Mietz, J.A., Unger, T., Huibregtse, J.M., Howley, P.M. (1992). The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.* 11, 5013-5020.
- Muhlner, U., Mohle-Steinlein, U., Witzmann-Voos, S., Christofori, G., Risau, W., Wagner, E.F. (1999). Formation of transformed endothelial cells in the absence of VEGFR-2/Flk-1 by Polyoma middle T oncogene. *Oncogene* 18, 4200-4210.
- Muller, G., Hecht, B., Helbl, V., Hinrichs, W., Saenger, W., Hillen, W. (1995). Characterization of non-inducible Tet repressor mutants suggests conformational changes necessary for induction. *Nat.Struct.Biol.* 2, 693-703.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 26, 99-109.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Noble, M., Groves, A.K., Ataliotis, P., Ikram, Z., Jat, P.S. (1995). The H-2KbtsA58 transgenic mouse: a new tool for the rapid generation of novel cell lines. *Transgenic Res.* 4, 215-225.
- Obinata, M. (2001). Possible applications of conditionally immortalized tissue cell lines with differentiation functions. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 286, 667-672.
- Okayasu, R., Suetomi, K., Yu, Y., Silver, A., Bedford, J.S., Cox, R., Ullrich, R.L. (2000). A deficiency in DNA repair and DNA-PKcs expression in the radiosensitive BALB/c mouse. *Cancer Res.* 60, 4342-4345.
- Oostendorp, R.A., Medvinsky, A.J., Kusadasi, N., Nakayama, N., Harvey, K., Orelia, C., Ottersbach, K., Covey, T., Ploemacher, R.E., Saris, C., Dzierzak, E. (2002). Embryonal subregion-derived stromal cell lines from novel temperature-sensitive SV40 T antigen transgenic mice support hematopoiesis. *J.Cell Sci.* 115, 2099-2108.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat.Cell Biol.* 5, 741-747.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlov, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., DePinho, R.A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-723.
- Quartin, R.S., Cole, C.N., Pipas, J.M., Levine, A.J. (1994). The amino-terminal functions of the simian virus 40 large T antigen are required to overcome wild-type p53-mediated growth arrest of cells. *J.Virol.* 68, 1334-1341.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
- Randle, D.H., Zindy, F., Sherr, C.J., Roussel, M.F. (2001). Differential effects of p19(Arf) and p16(Ink4a) loss on senescence of murine bone marrow-derived preB cells and macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 9654-9659.
- Rittling, S.R., Denhardt, D.T. (1992). p53 mutations in spontaneously immortalized 3T12 but not 3T3 mouse embryo cells. *Oncogene* 7, 935-942.
- Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., Perou, C.M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S.S., Van de, R.M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Botstein, D.,

- Brown,P.O. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat.Genet.* 24, 227-235.
- Ruppert,J.M., Stillman,B. (1993). Analysis of a protein-binding domain of p53. *Mol.Cell Biol.* 13, 3811-3820.
- Rybkin,I.I., Markham,D.W., Yan,Z., Bassel-Duby,R., Williams,R.S., Olson,E.N. (2003). Conditional expression of SV40 T-antigen in mouse cardiomyocytes facilitates an inducible switch from proliferation to differentiation. *J.Biol.Chem.* 278, 15927-15934.
- Sadowski,I., Ma,J., Triezenberg,S., Ptashne,M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.
- Saenz-Robles,M.T., Sullivan,C.S., Pipas,J.M. (2001). Transforming functions of Simian Virus 40. *Oncogene* 20, 7899-7907.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sauer,B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14, 381-392.
- Schadt,E.E., Monks,S.A., Drake,T.A., Lusis,A.J., Che,N., Colinayo,V., Ruff,T.G., Milligan,S.B., Lamb,J.R., Cavet,G., Linsley,P.S., Mao,M., Stoughton,R.B., Friend,S.H. (2003). Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature* 422, 297-302.
- Schagger,H., von Jagow,G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.* 166, 368-379.
- Schatz,S.M., Kerschbaumer,R.J., Gerstenbauer,G., Kral,M., Dorner,F., Scheiflinger,F. (2003). Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnol.Bioeng.* 84, 433-438.
- Seinsoth,S., Uhlmann-Schiffler,H., Stahl,H. (2003). Bidirectional DNA unwinding by a ternary complex of T antigen, nucleolin and topoisomerase I. *EMBO Rep.* 4, 263-268.
- Serrano,M., Lin,A.W., McCurrach,M.E., Beach,D., Lowe,S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Severino,J., Allen,R.G., Balin,S., Balin,A., Cristofalo,V.J. (2000). Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp.Cell Res.* 257, 162-171.
- Shan,L., He,M., Yu,M., Qiu,C., Lee,N.H., Liu,E.T., Snyderwine,E.G. (2002). cDNA microarray profiling of rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 23, 1561-1568.
- Sharpless,N.E., Bardeesy,N., Lee,K.H., Carrasco,D., Castrillon,D.H., Aguirre,A.J., Wu,E.A., Horner,J.W., DePinho,R.A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91.
- Sharpless,N.E., Ramsey,M.R., Balasubramanian,P., Castrillon,D.H., DePinho,R.A. (2004). The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379-385.
- Shay,J.W., Roninson,I.B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23, 2919-2933.
- Shelton,D.N., Chang,E., Whittier,P.S., Choi,D., Funk,W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr.Biol.* 9, 939-945.
- Sherr,C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60, 3689-3695.
- Sherr,C.J., DePinho,R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-410.

- Sherr,C.J., Roberts,J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Shockett,P., Difilippantonio,M., Hellman,N., Schatz,D.G. (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 6522-6526.
- Sitte,N., Merker,K., Grune,T., von Zglinicki,T. (2001). Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Exp.Gerontol.* 36, 475-486.
- Slack,A., Cervoni,N., Pinard,M., Szyf,M. (1999). DNA methyltransferase is a downstream effector of cellular transformation triggered by simian virus 40 large T antigen. *J.Biol.Chem.* 274, 10105-10112.
- Srinivasan,A., McClellan,A.J., Vartikar,J., Marks,I., Cantalupo,P., Li,Y., Whyte,P., Rundell,K., Brodsky,J.L., Pipas,J.M. (1997). The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Mol.Cell Biol.* 17, 4761-4773.
- Storch,K.F., Lipan,O., Leykin,I., Viswanathan,N., Davis,F.C., Wong,W.H., Weitz,C.J. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78-83.
- Stott,F.J., Bates,S., James,M.C., McConnell,B.B., Starborg,M., Brookes,S., Palmero,I., Ryan,K., Hara,E., Vousden,K.H., Peters,G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 17, 5001-5014.
- Sturn,A., Quackenbush,J., Trajanoski,Z. (2002). Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics.* 18, 207-208.
- Sullivan,C.S., Pipas,J.M. (2002). T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 66, 179-202.
- Tan,P.K., Downey,T.J., Spitznagel,E.L., Jr., Xu,P., Fu,D., Dimitrov,D.S., Lempicki,R.A., Raaka,B.M., Cam,M.C. (2003). Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res.* 31, 5676-5684.
- Tavazoie,S., Hughes,J.D., Campbell,M.J., Cho,R.J., Church,G.M. (1999). Systematic determination of genetic network architecture. *Nat.Genet.* 22, 281-285.
- te Poele,R.H., Okorokov,A.L., Jardine,L., Cummings,J., Joel,S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 62, 1876-1883.
- Tegtmeyer,P. (1975). Function of simian virus 40 gene A in transforming infection. *J.Virol.* 15, 613-618.
- TODARO,G.J., GREEN,H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J.Cell Biol.* 17, 299-313.
- Towbin,H., Staehelin,T., Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76, 4350-4354.
- Unsinger,J. (2001) Entwicklung retro- und adenoviraler Vektoren für die Gentherapie. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.
- Unsinger,J., Kroger,A., Hauser,H., Wirth,D. (2001). Retroviral vectors for the transduction of autoregulated, bidirectional expression cassettes. *Mol.Ther.* 4, 484-489.
- Unsinger,J., Lindenmaier,W., May,T., Hauser,H., Wirth,D. (2004). Stable and strictly controlled expression of LTR-flanked autoregulated expression cassettes upon adenoviral transfer. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 319, 879-887.
- Urlinger,S., Baron,U., Thellmann,M., Hasan,M.T., Bujard,H., Hillen,W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 7963-7968.

- Urlinger,S., Helbl,V., Guthmann,J., Pook,E., Grimm,S., Hillen,W. (2000a). The p65 domain from NF-kappaB is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system. *Gene* 247, 103-110.
- Varnum-Finney,B., Xu,L., Brashem-Stein,C., Nourigat,C., Flowers,D., Bakkour,S., Pear,W.S., Bernstein,I.D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat.Med.* 6, 1278-1281.
- Verhoeyen,E., Hauser,H., Wirth,D. (2001). Evaluation of retroviral vector design in defined chromosomal loci by Flp-mediated cassette replacement. *Hum.Gene Ther.* 12, 933-944.
- Villa,A., Snyder,E.Y., Vescovi,A., Martinez-Serrano,A. (2000). Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Exp.Neurol.* 161, 67-84.
- Vousden,K.H., Lu,X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat.Rev.Cancer* 2, 594-604.
- Weber,J.D., Taylor,L.J., Roussel,M.F., Sherr,C.J., Bar-Sagi,D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat.Cell Biol.* 1, 20-26.
- Wobus,A.M. (2001). Potential of embryonic stem cells. *Mol.Aspects Med.* 22, 149-164.
- Wodarczyk,C. (2004). Etablierung von ES-Zelllinien zur vorhersagbaren autoregulierten Expression von Transgenen in Mäusen. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.
- Woo,R.A., Poon,R.Y. (2004). Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev.* 18, 1317-1330.
- Wright,W.E., Shay,J.W. (2000). Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat.Med.* 6, 849-851.
- Wu,X., Avni,D., Chiba,T., Yan,F., Zhao,Q., Lin,Y., Heng,H., Livingston,D. (2004). SV40 T antigen interacts with Nbs1 to disrupt DNA replication control. *Genes Dev.* 18, 1305-1316.
- Wu,X., Li,Y., Crise,B., Burgess,S.M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749-1751.
- Yaciuk,P., Carter,M.C., Pipas,J.M., Moran,E. (1991). Simian virus 40 large-T antigen expresses a biological activity complementary to the p300-associated transforming function of the adenovirus E1A gene products. *Mol.Cell Biol.* 11, 2116-2124.
- Yang,I.V., Chen,E., Hasseman,J.P., Liang,W., Frank,B.C., Wang,S., Sharov,V., Saeed,A.I., White,J., Li,J., Lee,N.H., Yeatman,T.J., Quackenbush,J. (2002). Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol.* 3, research0062.
- Yoshida,Y., Hamada,H. (1997). Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 230, 426-430.
- Zalvide,J., Stubdal,H., DeCaprio,J.A. (1998). The J domain of simian virus 40 large T antigen is required to functionally inactivate RB family proteins. *Mol.Cell Biol.* 18, 1408-1415.
- Zhang,H., Pan,K.H., Cohen,S.N. (2003). Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 3251-3256.
- Zhu,J., Rice,P.W., Gorsch,L., Abate,M., Cole,C.N. (1992). Transformation of a continuous rat embryo fibroblast cell line requires three separate domains of simian virus 40 large T antigen. *J.Virol.* 66, 2780-2791.

## Anhang

Probe Set ID	Gene Symbol	MBa10+ vs MBa10-	MBa10R+ vs MBa10R-	MBa5+ vs MBa5-	MBa5R+ vs MBa5R-
		Induktionsfak tor	Induktionsfak tor	Induktionsfak tor	Induktionsfak tor
hochregulierte Gene					
1424046_at	Bub1	210.4	25.6	81.2	35.7
1416258_at	Tk1	68.1	24.0	36.3	20.5
1424278_a_at	Birc5	77.1	265.2	46.0	203.5
1433543_at	2900037I21Rik	47.5	29.6	31.1	28.8
1419943_s_at	Ccnb1	37.4	84.4	18.0	23.6
1416961_at	Bub1b	37.5	19.4	4.7	4.9
1426817_at	Mki67	64.4	38.4	608.9	130.5
1455990_at	Kif23	41.7	36.8	92.8	28.9
1417748_x_at	Foxm1	31.2	8.4	4.7	5.2
1430811_a_at	Cdca1	33.3	10.8	82.8	15.5
1454694_a_at	Top2a	35.7	26.8	30.0	29.0
1438009_at	Hist1h2ae	26.0	29.4	42.6	46.8
1452954_at	Ube2c	26.7	32.2	28.3	52.4
1415945_at	Mcnd5	23.2	23.4	25.8	23.7
1448627_s_at	Topk-pending	20.8	40.8	26.8	19.3
1422430_at	Figl1	21.8	9.9	25.4	9.6
1415810_at	Np95	16.6	14.1	15.9	16.5
1449705_x_at	Mcnd	16.8	7.7	10.5	12.1
1426580_at	Stk18	24.8	20.0	12.4	10.2
1416076_at	Ccnb1	22.2	81.5	21.4	92.7
1450920_at	Ccnb2	27.9	104.5	105.3	31.0
1448205_at	Ccnb1	12.5	12.4	15.8	26.5
1452534_a_at	Hmgb2	11.2	18.5	17.4	17.5
1452040_a_at	Grc8	11.3	22.8	17.0	69.7
1417911_at	Ccna2	17.3	20.5	25.9	35.1
1449060_at	Kif2c	16.5	11.7	19.4	16.0
1448314_at	Cdc2a	14.3	16.4	22.6	16.3
1451012_a_at	Csda	5.9	6.1	3.8	2.8
1448650_a_at	Pole	18.2	10.8	17.1	73.7
1419838_s_at	Stk18	14.2	15.8	9.3	11.7
1416251_at	Mcnd6	17.8	10.1	5.9	4.5
1423775_s_at	Prc1	8.2	9.4	8.4	7.3
1427161_at	Lek1	17.5	9.6	19.5	16.3
1426653_at	Mcnd	11.0	13.8	17.0	13.2
1426652_at	Mcnd	10.3	12.7	17.8	18.6
1448191_at	Plk	13.1	8.6	15.7	17.7
1420028_s_at	Mcnd	10.9	9.6	16.2	13.8
1417910_at	Ccna2	18.4	13.9	13.2	24.6
1424511_at	Stk6	11.5	12.0	15.3	16.9
1422628_at	AW413625	10.7	13.0	4.9	6.8
1418281_at	Rad51	13.3	11.1	10.5	13.7
1433408_a_at	2410041F14Rik	14.9	8.2	14.7	14.7

1418326_at	Slc7a5	12.3	12.2	4.8	9.0
1419153_at	2810417H13Rik	15.6	26.9	19.8	24.3
1425815_a_at	Hmmr	4.5	8.8	4.0	8.2
1424991_s_at	Tyms	9.8	5.4	7.2	7.0
1450842_a_at	Cenpa	9.1	6.3	7.8	6.8
1416802_a_at	2610036L13Rik	10.2	11.1	14.4	20.4
1450871_a_at	Bcat1	5.6	7.5	8.0	12.7
1415811_at	Np95	8.5	23.7	15.3	16.1
1434850_at	---	7.2	9.7	13.4	12.2
1429295_s_at	Trip13	7.5	6.1	7.5	10.0
1416042_s_at	Nasp	8.4	7.9	8.8	8.0
1453107_s_at	Pbp	9.0	7.2	10.8	7.0
1452917_at	Rfc5	5.3	4.0	5.7	6.4
1448777_at	Mcmd2	6.5	7.2	12.6	10.3
1451016_at	lfrd2	7.5	8.5	5.9	6.4
1454607_s_at	Psat-pending	6.3	7.4	7.1	8.2
1419254_at	Mthfd2	6.9	8.4	3.8	5.6
1422460_at	Mad2l1	6.3	5.4	12.0	7.9
1423714_at	Asf1b	7.0	8.4	5.6	7.7
1426533_at	Nol5a	5.6	5.7	6.2	4.9
1424942_a_at	Myc	4.7	5.2	3.9	4.5
1438761_a_at	Odc	5.3	4.3	2.1	3.4
1436454_x_at	Fen1	4.1	3.1	3.1	3.5
1428104_at	2610005B21Rik	5.6	5.3	5.9	6.5
1421731_a_at	Fen1	6.2	6.2	7.6	8.5
1419253_at	Mthfd2	5.0	4.5	3.3	5.1
1455035_s_at	Nol5a	7.6	4.9	5.3	4.6
1423674_at	Usp1	5.2	5.5	7.8	7.2
1416939_at	2010317E03Rik	6.1	6.6	3.9	3.5
1417457_at	Cks2	4.5	6.7	6.0	5.2
1451064_a_at	Psat-pending	9.6	9.0	7.1	12.5
1417822_at	G7e-pending	6.4	7.5	6.1	5.0
1452659_at	---	4.9	4.3	5.8	4.0
1451356_at	Anp32e	6.1	4.2	5.7	3.7
1422966_a_at	Trfr	4.2	5.3	7.1	5.4
1417511_at	Lyar	5.0	4.1	3.6	3.3
1423809_at	5730403J10Rik	6.2	6.7	4.9	6.7
1421260_a_at	Srm	5.2	5.0	4.5	4.0
1417144_at	Al451582	4.1	4.8	3.9	3.7
1451358_a_at	Racgap1	7.6	9.4	9.5	7.6
1420592_a_at	Anp32e	5.0	7.3	8.1	6.8
1417037_at	Orc6l	5.1	4.6	4.3	4.3
1428061_at	Hat1	5.1	4.0	3.6	4.3
1422509_at	U2af1	3.1	3.0	2.8	2.3
1416067_at	lfrd1	3.1	2.9	2.1	3.0
1452197_at	Smc4l1	3.8	4.4	4.0	4.2
1426609_at	4930513H15Rik	4.9	5.1	3.9	3.3
1418369_at	Prim1	5.6	6.4	8.5	7.4
1448635_at	Smc2l1	5.7	5.0	6.2	5.5
1417458_s_at	Cks2	5.3	5.6	5.6	4.1
1433507_a_at	Hmgn2	4.3	3.3	4.9	5.4

1416664_at	Cdc20	4.2	5.3	3.9	7.4
1427432_a_at	Silg41	2.9	2.7	2.9	2.7
1415860_at	Kpna2	4.6	4.0	3.7	4.1
1450986_at	Nol5	4.3	4.7	4.2	3.1
1439436_x_at	Incenp	5.5	5.7	5.6	6.9
1452661_at	Trfr	4.9	3.8	5.2	5.8
1426612_at	1110005A05Rik	4.1	3.7	4.3	5.1
1415807_s_at	Sfrs2	4.1	4.4	4.5	3.2
1426423_at	Shmt2	3.1	3.2	3.1	4.4
1416345_at	Timm8a	3.7	4.4	3.5	3.4
1454636_at	Cbx5	3.6	4.1	3.0	2.1
1417657_s_at	Zrf2	3.2	2.2	2.8	2.6
1427504_s_at	Sfrs2	4.0	3.6	3.7	4.3
1448833_at	Foxm1	4.4	4.4	9.9	6.0
1418481_at	Pkmyt1-pending	3.3	2.2	3.5	2.9
1423293_at	Rpa1	3.2	2.6	3.8	3.4
1424955_at	MGC36238	4.2	3.6	3.9	4.0
1416641_at	Lig1	4.2	3.8	8.4	5.0
1426630_at	Rrp4-pending	4.3	4.1	4.5	4.2
1416214_at	Mcmd4	5.1	3.5	5.1	5.6
1423431_a_at	Mybbp1a	4.0	3.9	3.0	2.9
1424883_s_at	9430065L19Rik	3.6	3.9	3.4	3.0
1438092_x_at	H2afz	3.7	3.6	3.5	3.6
1424143_a_at	Ris2	4.5	4.8	6.9	6.1
1423920_at	A730011O11Rik	2.7	3.1	4.1	5.9
1423675_at	Usp1	4.7	4.4	5.7	4.5
1428869_at	Nolc1	4.1	5.3	6.1	3.6
1452036_a_at	Tmpo	3.6	3.3	5.1	3.8
1438168_x_at	Ddx39	3.7	4.6	3.2	2.5
1416746_at	H2afx	4.2	3.5	4.0	3.6
1417586_at	Timeless	3.9	3.2	6.6	5.5
1451092_a_at	Rangap1	3.7	3.6	3.9	4.3
1421081_a_at	Banf1	3.6	3.5	2.6	2.8
1426349_s_at	Tmpo	3.2	3.2	3.0	3.1
1417724_at	Refbp1	3.5	4.3	2.7	3.4
1452712_at	2610209F03Rik	3.0	2.8	2.7	2.6
1439377_x_at	Cdc20	3.0	3.3	2.7	5.9
1416698_a_at	Cks1	3.1	2.9	2.3	2.3
1417947_at	Pcna	4.8	4.2	5.0	4.7
1415878_at	Rrm1	4.2	4.6	5.9	5.2
1451296_x_at	Pabpc4	3.6	3.5	2.7	2.9
1426853_at	Set	3.6	2.9	2.1	2.4
1423772_x_at	Slc25a5	3.0	2.7	2.4	2.1
1416073_a_at	Pcnt2	2.8	3.4	2.8	2.5
1448441_at	Cks1	3.7	3.7	3.2	2.3
1448462_at	Tdg	2.6	2.7	3.4	2.7
1415773_at	Ncl	3.2	2.7	4.1	3.0
1450416_at	Cbx5	2.8	3.6	2.7	2.2
1423521_at	Csnb	2.5	2.3	3.7	2.3
1416684_at	Fbl	2.4	3.0	2.7	3.0
1460253_at	Al481279	3.4	3.3	2.9	2.1



1419736_a_at	1500010B24Rik	3.0	4.1	3.0	2.4
1437621_x_at	Phgdh	2.8	3.1	3.8	5.3
1448809_at	Cse1l	3.7	3.6	3.2	3.1
1416685_s_at	Fbl	2.8	2.5	2.3	2.3
1422993_s_at	Refbp2	3.9	4.1	3.4	3.2
1432016_a_at	Idh3a	3.5	3.4	2.7	2.3
1435800_a_at	Csda	4.0	4.5	4.3	3.7
1423643_at	Ddx39	3.5	3.5	2.6	2.2
1451080_at	Usp1	3.8	4.5	5.2	4.9
1460168_at	Slbp	3.5	3.3	3.2	3.1
1438091_a_at	H2afz	3.2	3.7	3.8	4.1
1422767_at	Bysl	2.6	2.7	2.5	2.1
1416439_at	2410015N17Rik	3.6	3.3	2.6	4.0
1426789_s_at	Ssrp1	3.2	3.7	2.7	2.2
1416544_at	Ezh2	2.9	3.8	6.2	4.5
1448536_at	1010001J12Rik	3.8	3.8	3.1	4.0
1421082_s_at	Banf1	3.3	2.8	2.3	2.4
1426351_at	Hspd1	3.2	3.3	2.5	2.4
1416606_s_at	D11Ert175e	2.8	3.3	2.2	2.7
1451103_at	9430093H08Rik	2.6	3.2	6.1	4.0
1415852_at	Impdh2	3.1	3.0	2.4	2.2
1415851_a_at	Impdh2	2.7	3.1	2.3	2.2
1418439_at	2900055D03Rik	2.5	2.9	2.6	2.7
1448127_at	Rrm1	3.3	3.6	5.2	6.3
1423430_at	Mybbp1a	3.5	4.5	3.9	2.5
1437859_x_at	MGC6725	3.0	3.1	2.3	2.1
1420991_at	Crap	2.8	2.9	4.4	2.1
1455084_x_at	Shmt2	3.2	3.1	3.6	4.5
1448277_at	Pold2	2.6	3.2	3.7	4.2
1452439_s_at	Sfrs2	3.0	3.1	4.8	3.5
1422946_a_at	Dnmt1	3.1	3.6	3.2	3.4
1415829_at	Lbr	3.0	2.5	6.5	4.8
1419472_s_at	Nudc	2.9	2.6	2.3	2.3
1423823_at	2610012O22Rik	2.8	2.6	2.6	3.8
1454955_at	A330055O14Rik	2.8	2.9	2.1	2.1
1448604_at	Uck2-pending	2.7	3.4	3.9	2.5
1415849_s_at	Stmn1	2.2	2.3	7.7	5.4
1422547_at	Ranbp1	3.2	3.4	2.4	2.4
1451095_at	Asns	2.3	2.7	2.5	4.2
1415771_at	Ncl	2.9	2.5	2.9	2.9
1416235_at	AA959742	2.9	2.8	2.8	2.0
1436349_at	2700094K13Rik	2.3	2.3	2.2	2.7
1448451_at	Ak2	3.0	5.0	2.8	3.0
1448791_at	Snx5	2.6	2.6	2.7	2.1
1428390_at	Picalm	3.3	3.7	2.6	2.6
1426657_s_at	Phgdh	2.8	3.5	3.8	6.7
1448484_at	Amd1	2.6	2.8	2.9	2.3
1418226_at	Orc2l	2.9	3.1	2.6	3.6
1416362_a_at	Fkbp4	3.0	3.2	2.6	2.7
1416184_s_at	Hmga1	3.6	3.0	3.1	2.5
1416925_at	Kpnb1	2.8	3.9	2.1	2.0

1416726_s_at	6720465F12Rik	3.1	3.7	2.8	3.4
1421046_a_at	Pabpc4l	2.7	3.0	2.6	2.7
1452430_s_at	Sfrs1	2.3	2.4	3.7	2.6
1422502_at	Adprt1	2.4	2.8	2.9	2.7
1437309_a_at	Rpa1	2.7	2.6	3.1	2.9
1448271_a_at	Ddx21	3.6	3.8	3.7	3.3
1428099_a_at	Sfrs1	2.2	2.7	3.5	3.2
1438977_x_at	Ran	2.6	2.3	2.2	2.7
1418334_at	Ask-pending	3.1	3.4	4.9	5.6
1425142_a_at	Hnrpd	3.1	3.5	2.7	2.8
1420368_at	Denr	2.4	2.6	2.1	2.0
1423440_at	1110001A07Rik	2.4	3.0	4.1	2.8
1417506_at	Gmnn	3.9	4.2	4.4	4.9
1430542_a_at	Slc25a5	2.7	2.8	2.2	2.4
1416605_at	D11Ert175e	2.8	4.5	2.7	3.8
1439463_x_at	Hmgb1	2.8	3.0	2.9	3.6
1419543_a_at	Silg41	2.5	2.9	2.6	2.5
1426736_at	Gspt1	2.6	2.8	2.6	2.2
1426394_at	2700079K05Rik	2.2	2.6	2.2	2.3
1436874_x_at	Slc25a5	3.0	2.6	2.3	2.1
1426751_s_at	AW541137	2.5	2.8	3.0	3.3
1415925_a_at	Nup62	3.2	2.9	2.7	2.1
1421052_a_at	Sms	2.3	2.5	4.3	4.0
1421819_a_at	Set	3.4	3.0	2.8	2.6
1448472_at	Vars2	3.6	4.0	5.2	4.5
1426790_at	Ssrp1	3.0	3.2	2.8	2.8
1419452_at	Uchl5	3.2	2.6	3.7	2.4
1423723_s_at	Tardbp	2.7	2.5	2.7	2.4
1453849_s_at	Hnrpab	2.6	2.8	2.5	2.0
1453722_s_at	Sfrs1	2.6	2.6	3.0	2.7
1417082_at	Anp32b	3.6	2.6	3.0	2.4
1421083_x_at	Banf1	3.1	2.8	2.4	2.2
1433656_a_at	Ns-pending	2.6	3.0	2.5	3.0
1416167_at	Prdx4	2.9	2.8	2.7	2.2
1423919_at	MGC36997	2.7	2.8	3.3	2.9
1427913_at	2610002D06Rik	2.1	2.5	2.3	2.2
1426854_a_at	Set	2.3	2.7	2.3	2.0
1423969_at	2810039M17Rik	2.4	2.3	2.0	2.2
1416790_a_at	Tdg	2.1	2.0	2.3	2.9
1415909_at	Stip1	2.4	2.8	2.2	2.2
1449059_a_at	Oxct	2.1	2.1	3.6	2.7
1450714_at	Oazin	2.4	2.7	2.7	2.8
1416415_a_at	H2afz	2.6	3.4	3.0	3.6
1416212_at	Magoh	2.4	2.6	2.4	2.3
1448450_at	Ak2	3.8	4.3	2.8	2.7
1427439_s_at	Skb1	3.4	3.9	2.7	2.7
1426788_a_at	Ssrp1	2.7	2.7	2.5	2.4
1425048_a_at	Hmgb1	2.1	2.1	2.3	2.5
1418079_at	Psme3	2.4	2.3	2.8	2.3
1416150_a_at	Sfrs3	2.8	3.1	3.8	2.8
1456227_x_at	Rbbp7	2.1	3.1	2.5	2.0

1416906_at	Anapc5	2.3	2.0	2.5	2.4
1435715_x_at	Tdg	2.2	2.2	2.4	3.2
1418022_at	Narg1	2.4	3.0	2.4	2.1
1416336_s_at	Snrpd1	3.0	3.7	2.0	2.4
1418627_at	Gclm	2.3	2.1	2.4	2.3
1453307_a_at	Anapc5	2.4	2.6	2.2	2.3
1416176_at	Hmgb1	2.3	2.7	2.6	2.6
1418274_at	Nutf2	2.6	2.5	3.1	2.3
1424019_at	Nol1	2.1	2.5	2.2	2.1
1415704_a_at	Cdv3	2.2	2.4	2.4	2.5
1434578_x_at	Ran	2.1	2.9	2.6	2.7
1448236_at	Rdx	2.4	2.0	2.7	2.3
1435324_x_at	Hmgb1	2.2	2.5	2.4	2.6
1423531_a_at	Hnrpa1	2.9	2.5	2.7	2.2
1435178_x_at	Anapc5	2.0	2.3	2.1	2.1
1452052_s_at	2700079K05Rik	2.1	2.1	2.3	2.5
1434801_x_at	Slc25a5	2.6	3.1	2.5	2.4
1415914_at	Hnrpab	2.1	2.2	2.3	2.1
1416835_s_at	Amd1	2.3	2.7	2.2	2.7
1418443_at	Xpo1	2.3	2.7	3.6	3.6
1422801_at	G3bp-pending	2.1	2.9	2.3	2.2
1435177_a_at	Anapc5	2.5	2.6	2.2	2.3
1416162_at	Rad21	2.1	2.1	2.7	2.1
1417503_at	Rfc2	2.2	2.5	2.3	2.7
1417057_a_at	Ppid	2.0	3.3	2.7	2.9
reprimierte Gene					
1448158_at	Sdc1	-3.3	-2.5	-2.9	-2.4
1418670_s_at	Hspg2	-2.4	-2.4	-2.1	-2.5
1450927_at	Lztr1	-2.9	-2.9	-2.1	-2.3
1451247_at	1200003O06Rik	-2.1	-2.3	-2.7	-2.1
1426940_at	LOC214597	-2.5	-2.2	-2.5	-2.1
1424184_at	Acadvl	-2.1	-2.2	-4.0	-2.4
1419066_at	2610524G09Rik	-2.6	-2.8	-2.1	-2.2
1448868_at	Scand1	-2.2	-2.2	-3.7	-2.1
1416522_a_at	Grcc10	-2.6	-2.2	-2.2	-2.0
1437044_a_at	Gba	-2.4	-2.7	-3.0	-2.6
1426499_at	Sh3glb2	-2.2	-2.5	-2.4	-2.3
1420911_a_at	Mfge8	-2.7	-2.5	-2.8	-2.6
1418865_at	Zfp385	-2.8	-3.9	-3.0	-2.5
1448615_at	Ccs	-2.8	-2.3	-4.0	-2.5
1448569_at	Cd8b	-2.4	-2.6	-2.6	-2.3
1416683_at	Plxnb2	-2.0	-2.0	-2.2	-2.2
1432264_x_at	Cox7a2l	-2.3	-2.6	-3.0	-2.5
1426846_at	G630055P03Rik	-3.0	-2.2	-2.4	-2.7
1433666_s_at	Vps41	-3.1	-3.3	-2.7	-2.5
1419745_at	4933428G20Rik	-2.9	-3.8	-3.1	-2.8
1416330_at	Cd81	-3.0	-3.2	-2.4	-2.5
1449151_at	Pctk3	-2.3	-2.3	-2.2	-2.2
1432144_a_at	Zfp363	-2.5	-3.1	-2.2	-2.1
1455002_at	Ptp4a1	-2.6	-2.5	-2.7	-2.3
1434059_at	B230312A22Rik	-2.5	-2.5	-2.6	-3.1

1422476_at	Ifi30	-2.3	-2.4	-2.6	-2.1
1415943_at	Sdc1	-2.7	-2.7	-2.9	-2.7
1434066_at	Gtf3c1	-2.8	-3.6	-2.8	-2.9
1432263_a_at	Cox7a2l	-2.3	-2.6	-2.8	-2.2
1416687_at	Plod2	-2.7	-3.0	-4.8	-3.0
1416969_at	Gtse1	-3.4	-4.4	-2.9	-2.4
1423729_a_at	2500002L14Rik	-2.5	-3.6	-2.4	-2.5
1420621_a_at	App	-2.7	-2.6	-4.1	-3.8
1426434_at	1200015A22Rik	-2.6	-3.0	-2.0	-2.2
1426965_at	---	-2.7	-2.9	-2.7	-2.3
1416686_at	Plod2	-2.8	-3.9	-3.7	-3.4
1416261_at	2810428F02Rik	-3.9	-5.2	-2.3	-2.3
1421088_at	Gpc4	-2.3	-2.2	-2.4	-2.2
1426719_at	Apbb2	-3.0	-2.5	-2.2	-2.2
1423104_at	Irs1	-3.1	-2.4	-2.8	-2.6
1422433_s_at	ldh1	-2.7	-3.2	-3.6	-3.2
1418000_a_at	Itm2b	-3.1	-2.9	-2.3	-2.1
1415944_at	Sdc1	-4.9	-3.8	-3.9	-2.9
1426397_at	Tgfbr2	-2.9	-3.0	-2.1	-2.1
1418509_at	Cbr2	-3.6	-4.1	-7.3	-5.4
1417446_at	Slc12a4	-3.1	-2.8	-3.1	-2.9
1424771_at	E130307C13	-4.1	-6.9	-4.8	-3.3
1452219_at	DKFZp434P053 1	-3.1	-3.7	-2.5	-2.7
1436991_x_at	Gsn	-3.1	-2.7	-2.4	-2.3
1448757_at	Pml	-3.4	-3.0	-3.2	-3.6
1439069_a_at	---	-2.9	-2.5	-2.9	-2.3
1416503_at	Lxn	-2.7	-4.3	-2.3	-2.6
1423309_at	Ttgn1	-3.1	-2.9	-2.3	-2.1
1426614_at	2010005I16Rik	-3.8	-3.5	-2.6	-3.3
1419457_at	Rgnf	-5.4	-4.6	-4.3	-4.2
1424188_at	MGC30493	-2.7	-2.6	-2.2	-2.1
1418483_a_at	Ggta1	-3.9	-3.6	-3.0	-2.2
1450099_a_at	Gba	-3.3	-2.8	-2.8	-2.1
1424175_at	Tef	-3.7	-3.8	-2.7	-2.1
1449168_a_at	Akap2	-2.7	-2.8	-2.9	-3.0
1460346_at	Arsa	-3.2	-4.1	-3.4	-2.9
1416383_a_at	Pcx	-3.7	-5.6	-5.2	-3.7
1456133_x_at	Itgb5	-3.7	-3.7	-2.4	-3.0
1452272_a_at	Gfer	-3.3	-2.7	-2.8	-2.4
1448812_at	Hpcal1	-3.8	-3.6	-3.5	-3.2
1448118_a_at	Ctsd	-4.2	-4.5	-3.6	-2.8
1455090_at	---	-4.0	-3.2	-3.4	-2.2
1452330_a_at	1200013A08Rik	-4.5	-4.7	-3.6	-3.4
1428308_at	1110004D19Rik	-3.4	-4.4	-4.4	-4.0
1428050_a_at	0610007H07Rik	-3.5	-3.3	-2.9	-2.5
1416555_at	Ei24	-3.4	-3.3	-2.6	-2.3
1426995_a_at	Gfer	-3.4	-3.3	-4.9	-3.5
1416109_at	0610006A03Rik	-4.9	-4.4	-4.0	-2.6
1417611_at	Pr1	-2.5	-2.0	-2.4	-2.0
1434642_at	Hsd17b11	-4.0	-4.9	-2.7	-2.9

1415961_at	Itm2c	-3.9	-3.1	-3.2	-2.6
1426238_at	Bmp1	-4.0	-3.3	-2.3	-2.2
1417533_a_at	Itgb5	-3.6	-3.1	-2.2	-2.4
1448239_at	Hmox1	-3.6	-3.6	-2.6	-2.1
1437171_x_at	Gsn	-2.9	-2.7	-2.8	-2.0
1426387_x_at	---	-4.1	-3.0	-3.2	-3.1
1415975_at	Carhsp1	-4.1	-4.0	-3.7	-2.4
1427191_at	LOC230103	-4.3	-4.9	-7.6	-4.7
1450223_at	Apaf1	-4.2	-3.8	-2.4	-2.6
1415929_at	Map1lc3	-3.9	-3.9	-2.4	-2.2
1459985_at	2700038L12Rik	-3.6	-4.4	-5.3	-4.3
1422465_a_at	Nxn	-4.4	-4.4	-2.8	-2.6
1451132_at	4732463H20Rik	-3.9	-3.8	-2.9	-3.0
1426083_a_at	Btg1	-4.0	-3.7	-3.2	-2.6
1449002_at	Phlda3	-3.9	-4.8	-2.8	-2.0
1417455_at	Tgfb3	-2.9	-2.9	-2.1	-2.5
1420851_at	Pard6g	-4.5	-4.9	-3.6	-2.4
1452589_at	Ptk7	-4.3	-6.6	-4.2	-2.8
1434975_x_at	---	-4.2	-3.8	-3.9	-3.5
1434299_x_at	2600013G09Rik	-5.2	-5.8	-3.0	-2.1
1451329_at	0610006K04Rik	-3.9	-3.9	-3.1	-3.2
1424726_at	MGC25977	-3.8	-3.1	-4.5	-3.6
1417162_at	2310061B02Rik	-3.8	-4.2	-3.7	-2.9
1452540_a_at	Hist1h2bp	-4.6	-3.4	-10.3	-14.3
1452041_at	---	-5.2	-6.7	-5.8	-5.1
1419584_at	BC002262	-5.7	-5.5	-3.1	-2.8
1438403_s_at	Ramp2	-3.9	-2.8	-3.3	-4.8
1418711_at	Pdgfa	-3.6	-4.1	-3.0	-2.7
1416344_at	Lamp2	-5.0	-3.7	-3.1	-2.7
1424640_at	1110033P22Rik	-4.0	-4.6	-2.6	-2.0
1417534_at	Itgb5	-3.6	-3.3	-2.6	-2.4
1424308_at	Slc24a3	-5.9	-6.8	-4.2	-3.8
1421002_at	Angptl2	-5.0	-4.4	-3.9	-2.8
1424670_s_at	1110013H04Rik	-3.1	-2.9	-3.4	-2.3
1422684_a_at	Sec8	-5.2	-4.5	-2.9	-2.8
1449483_at	Polk	-4.8	-5.2	-4.4	-3.4
1460167_at	Aldh7a1	-4.5	-3.3	-2.9	-2.1
1428309_s_at	1110004D19Rik	-4.4	-3.7	-4.6	-4.1
1419630_a_at	Trim11	-5.1	-5.6	-3.5	-3.1
1434831_a_at	1110048B16Rik	-7.0	-6.2	-3.0	-2.9
1450085_at	Angptl2	-4.8	-4.3	-3.6	-2.9
1426624_a_at	0610043B10Rik	-5.6	-5.4	-4.4	-3.5
1456195_x_at	Itgb5	-4.9	-3.9	-2.1	-2.5
1424777_at	1110018E21Rik	-5.8	-5.3	-4.1	-3.3
1449520_at	BC002262	-5.0	-6.5	-3.4	-2.8
1417902_at	Slc19a2	-5.3	-7.4	-3.4	-3.1
1448148_at	Grn	-4.6	-4.3	-2.3	-2.2
1448102_a_at	2700038L12Rik	-5.9	-4.2	-5.5	-3.8
1420827_a_at	Ccng1	-6.4	-5.3	-3.8	-2.9
1416183_a_at	Ldh2	-6.7	-6.4	-4.5	-4.2
1436944_x_at	---	-5.0	-3.5	-3.0	-2.8

1428120_at	1110017H11Rik	-6.4	-4.4	-4.7	-4.8
1418188_a_at	Ramp2	-6.1	-2.3	-3.3	-5.2
1450644_at	Zfp36l1	-5.4	-3.6	-2.6	-2.4
1417999_at	Itn2b	-4.2	-4.8	-3.4	-2.8
1418634_at	Notch1	-5.4	-5.6	-6.1	-4.1
1455550_x_at	Tde1	-5.4	-4.7	-3.6	-2.9
1450016_at	Ccng1	-6.7	-5.3	-2.7	-3.1
1422184_a_at	Ak1	-6.2	-6.0	-3.2	-3.0
1424226_at	9030617O03Rik	-5.0	-5.3	-4.5	-3.7
1448613_at	Ecm1	-6.9	-6.2	-4.9	-5.5
1435353_a_at	---	-5.7	-5.1	-4.2	-3.6
1449152_at	Cdkn2b	-5.9	-4.7	-3.4	-2.4
1424167_a_at	Pmm1	-6.3	-6.2	-4.9	-4.1
1422686_s_at	Sec8	-4.9	-6.1	-2.8	-3.3
1432143_a_at	1700058O05Rik	-5.5	-4.5	-3.0	-2.3
1438602_s_at	Masp1	-7.2	-5.5	-6.3	-3.8
1415996_at	Txnip	-10.0	-9.1	-3.2	-2.2
1452378_at	2210401K01Rik	-6.5	-3.5	-3.5	-3.7
1416798_a_at	Nme4	-5.2	-5.6	-5.4	-3.6
1423754_at	Fgls-pending	-5.6	-6.2	-3.1	-2.1
1422466_at	Nxn	-6.3	-7.4	-4.7	-3.3
1454606_at	4933426M11Rik	-7.0	-8.7	-3.9	-3.5
1460367_at	1700058O05Rik	-6.5	-6.3	-4.1	-3.2
1448313_at	Cln2	-7.2	-5.6	-3.8	-2.7
1452141_a_at	Sepp1	-7.8	-10.4	-4.4	-3.2
1439259_x_at	1110035H23Rik	-7.0	-6.6	-4.3	-3.9
1454967_at	A930001N09Rik	-6.7	-7.5	-4.3	-5.0
1450935_at	Ercc5	-7.5	-7.3	-6.5	-6.9
1424906_at	E030024M05Rik	-7.9	-8.8	-8.4	-3.8
1417815_a_at	Tde1	-5.7	-4.4	-4.8	-2.7
1452770_at	D7Wsu86e	-5.8	-6.5	-3.6	-2.5
1425985_s_at	Masp1	-9.0	-5.8	-8.0	-4.6
1456080_a_at	---	-5.2	-4.6	-4.6	-2.7
1422514_at	Aebp1	-7.3	-7.4	-2.2	-2.5
1418578_at	Dgka	-12.9	-16.7	-12.2	-7.3
1423605_a_at	Mdm2	-7.5	-7.6	-3.2	-3.6
1449353_at	Wig1	-6.9	-5.8	-3.5	-3.0
1448200_at	Tcn2	-9.6	-8.6	-6.2	-4.0
1428083_at	2310043N10Rik	-6.0	-5.2	-2.1	-2.4
1456424_s_at	Pltp	-17.4	-11.2	-10.7	-7.2
1448237_x_at	Ldh2	-8.3	-9.6	-5.7	-4.3
1415997_at	Txnip	-8.3	-5.7	-2.4	-2.1
1450017_at	Ccng1	-7.3	-6.6	-3.5	-3.9
1426117_a_at	Slc19a2	-8.2	-7.6	-3.1	-3.1
1427718_a_at	Mdm2	-9.9	-6.4	-3.5	-3.6
1451751_at	1700037B15Rik	-9.6	-10.4	-7.4	-6.8
1430780_a_at	Pmm1	-8.4	-6.7	-5.9	-4.2
1416315_at	1110035H23Rik	-7.9	-7.5	-4.7	-4.2
1448272_at	Btg2	-9.8	-8.6	-4.7	-4.9
1448380_at	Ppicap	-11.0	-15.4	-6.4	-4.8

1426858_at	Inhbb	-8.5	-8.7	-5.0	-5.1
1425789_s_at	Anxa8	-8.8	-9.3	-9.2	-9.1
1418181_at	Ptp4a3	-8.2	-9.1	-4.2	-3.8
1416250_at	Btg2	-9.8	-12.0	-5.5	-5.0
1434768_at	Cln2	-10.8	-12.4	-6.6	-4.6
1455235_x_at	Ldh2	-10.9	-7.7	-4.8	-4.3
1418674_at	Osmr	-11.5	-12.5	-4.0	-3.7
1439332_at	1700037B15Rik	-8.7	-16.8	-8.6	-7.2
1416271_at	Perp-pending	-12.1	-14.3	-3.7	-2.9
1452291_at	LOC212285	-10.9	-11.0	-5.9	-5.0
1424638_at	Cdkn1a	-12.7	-10.7	-4.0	-3.8
1450637_a_at	Aebp1	-10.7	-10.3	-2.9	-2.8
1422438_at	Ephx1	-12.4	-11.6	-5.6	-5.7
1416239_at	Ass1	-12.0	-13.0	-6.3	-5.0
1428306_at	Rtp801-pending	-14.5	-10.7	-4.1	-3.2
1425416_s_at	Dda3-pending	-14.5	-8.0	-7.2	-5.1
1418288_at	Lpin1	-20.8	-17.4	-12.3	-10.2
1416101_a_at	Hist1h1c	-16.0	-19.9	-9.0	-6.7
1421964_at	Notch3	-21.7	-25.4	-8.3	-11.3
1417311_at	Crip2	-18.0	-15.6	-5.6	-4.4
1421965_s_at	Notch3	-29.1	-33.6	-7.9	-8.3
1417323_at	Dda3-pending	-14.2	-14.6	-5.2	-4.5
1434499_a_at	Ldh2	-11.6	-13.1	-5.6	-5.3
1421679_a_at	Cdkn1a	-20.2	-20.2	-6.5	-6.4
1416455_a_at	Cryab	-23.1	-73.4	-6.1	-5.6
1434092_at	2310065A03Rik	-15.8	-16.0	-10.3	-13.2
1421840_at	Abca1	-16.0	-19.7	-5.4	-6.0
1416926_at	Stinp	-26.2	-19.2	-6.0	-4.8
1417963_at	Pltp	-34.6	-22.5	-10.9	-7.6
1416927_at	Stinp	-9.8	-9.1	-6.6	-6.6
1430388_a_at	Sulf2-pending	-24.6	-16.3	-10.0	-10.4
1416996_at	Vrp-pending	-24.5	-85.9	-15.3	-7.5
1416666_at	Serpine2	-25.5	-18.5	-9.2	-6.2
1426260_a_at	Ugt1a1	-26.3	-22.8	-8.2	-4.9
1418072_at	Hist1h2bc	-35.2	-22.9	-8.5	-13.0
1421839_at	Abca1	-36.8	-22.2	-5.2	-8.9
1455582_at	---	-22.8	-10.3	-6.1	-3.9
1419456_at	Dcxr	-33.5	-37.5	-13.1	-14.0
1426516_a_at	Lpin1	-57.7	-11.2	-10.6	-8.3
1451019_at	Ctsf	-46.2	-8.4	-9.4	-22.4

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bode und Herrn Prof. Dr. Cerff danke ich dafür, dass sie diese Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Braunschweig vertreten. Herrn Prof. Dr. Jahn danke ich für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Frau Dr. Dagmar Wirth und Herrn Dr. Hansjörg Hauser in der Arbeitsgruppe Regulation und Differenzierung an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Braunschweig angefertigt.

Mein besonderer Dank geht sowohl an Dagmar als auch an Hansjörg für ihre hervorragende Betreuung und ihre ständige Bereitschaft äußerst konstruktiv auf meine Ideen einzugehen.

Außerdem danke ich allen Kollegen mit denen ich während meiner Doktorarbeit eine äußerst angenehme Zeit hatte. Beim Viruslabor bedanke ich mich für all die Schandtaten, die die „Anderen“ am Dienstagmorgen anmeckerten. Bei den „Anderen“ bedanke ich mich dafür, dass Sie am Dienstagmorgen das Viruslabor anmeckerten.

Bei Sabine Lehne bedanke ich mich für all die Kultivierungen bei 32°C, 37°C und 39°C und für all Ihre Hilfen, die Sie ständig anbot.

Bei Andrea Kröger bedanke ich mich für die Einführung in die faszinierende, sterile Welt des Maushauses.

An Maria Höxter geht mein Dank für Ihren fachlichen Rat, wenn es um FACSen ging.

Bei Simone Wassmann und Sabine Herrmann bedanke ich mich für Ihren unermüdlichen Einsatz in der Bezwingung von Access, Genesis, GenMaPP und so weiter.

Bei Roland Geffers und Tanja Töpfer bedanke ich mich für die hervorragende Affymetrixanalyse.